

Mechanobiologische Untersuchungen zur
Rolle von Keratin, Aktin und
Adhärenzverbindungen während der
Differenzierung epithelialer Zellen
in vitro

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Lena Ramms

aus
Bergisch Gladbach

Bonn, April 2017

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

- | | |
|---------------|------------------------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. Rudolf Merkel |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck |

Tag der Disputation: 07.07.2017
Erscheinungsjahr: 2017

Zusammenfassung

Die Haut stellt die größte und wichtigste Schutzbarriere des menschlichen Körpers gegenüber externen Reizen dar. Bei genetischen Erkrankungen wie Epidermolysis bullosa simplex sind die mechanischen Eigenschaften der Hautzellen jedoch verändert und die Integrität der Haut gestört, wodurch ihrer Fragilität erhöht ist und eine funktionelle Schutzfunktion nicht länger aufrecht erhalten werden kann. Grund hierfür sind häufig Veränderungen des Proteins Keratin, welches als zytoskelettaler Hauptbestandteil epidermaler Zellen maßgeblich für ihre mechanischen Eigenschaften und die Aufrechterhaltung einer intakten Schutzfunktion verantwortlich ist. Um Hautkrankheiten wie Epidermolysis bullosa simplex (EBS) detailliert zu verstehen und mögliche Heilungsansätze zu generieren, müssen die genauen Ursachen der Krankheit aufgeklärt werden.

Aus diesem Grund beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit der Analyse der mechanischen Eigenschaften von Zellen mit unterschiedlichen Keratinnetzwerken, welche unter anderem die EBS-assoziierte Mutation R131P im Keratin 14 tragen. Hierfür wurden in dieser Arbeit mittels Rasterkraftmikroskopie die Zellelastizitäten von Kontroll-Keratinocyten, keratinfreien Keratinocyten sowie von Keratinocyten, welche nur bestimmte Keratine exprimieren, analysiert. Für keratinfreie Keratinocyten wurde eine signifikante Reduzierung der Zellelastizität nachgewiesen, während die Zellelastizität in keratinfreien Keratinocyten, welche das Keratin 14 exprimieren sich nicht von der Steifigkeit der Kontrollzellen unterschied. Überraschenderweise führte die Expression von Keratin 14 mit der EBS-assoziierten Mutation zu einer reduzierten Zellsteifigkeit, welche noch geringer war als die keratinfreier Keratinocyten.

Eine Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration führt *in vivo* zur epidermalen Differenzierung und geht mit zytoskelettalen Veränderungen sowie der Ausbildung von kalziumabhängigen Adhärenzverbindungen einher. Die Untersuchung der Zellelastizität unter Kalziumeinfluss *in vitro* zeigte für Keratinocyten mit verschiedenen Keratinnetzwerken eine signifikante Erhöhung der Zellsteifigkeit. Die Elastizität der Kontrollzellen unterschied sich unter Kalziumeinfluss signifikant von der Elastizität von Zellen mit veränderten Keratinnetzwerken und verdeutlichte dadurch die enorme Bedeutung eines funktionellen Keratinnetzwerkes für die Ausbildung einer intakten Haut.

Desweiteren konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration zu einer signifikanten Beschleunigung der Aktinfaserreorientierung infolge uniaxialer, zyklischer Dehnung führt. Anhand von vergleichenden Dehnungsexperimenten an Einzelzellen und konfluenten Zellschichten, in Ab- und Anwesenheit von Kalzium, konnten mechanosensitive, kalziumabhängige Adherens Junctions als mechanosensitiver Mechanismus und Grund für die beschleunigte Reorientierung identifiziert werden. Als zentraler Bestandteil dieses Mechanismus konnte das Protein α -Catenin ausgemacht werden, welches für die kalziumabhängige, adherens junctions-vermittelte Aktinfaserreorientierung von großer Bedeutung ist, wie die reduzierte Aktinfaserreorientierung in α -cateninfreien Zellen gezeigt hat. Die Adherens Junction-vermittelte Aktinfaserreorientierung konnte in dieser Arbeit als zusätzlicher Mechanismus der Aktinfaserreorientierung identifiziert werden, welcher die Ausbildung kalziumabhängiger Adhärenzverbindungen voraussetzt und aufgrund dessen nur in konfluenten Zellschichten unter Kalziumeinfluss aktiv ist. In diesen Zellen führt er nicht nur zu einer beschleunigten Reorientierung sondern sogar zu einer Erhöhung der maximalen Aktinfaserreorientierung senkrecht zur Zugrichtung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau, Funktion und epidermale Differenzierung der Haut	1
1.2	Zusammensetzung und Funktion des Zytoskeletts	4
1.2.1	Aufbau und Funktion von Intermediärfilamenten	4
1.2.1.1	Zusammenlagerung und Expression von Keratinen	5
1.2.1.2	Der Keratin-Zyklus: Nukleation, Elongation, Integration und Reifung	7
1.2.2	Aufbau und Funktion von Mikrofilamenten	9
1.3	Zelluläre Adhäsionen	11
1.3.1	Struktur und Funktion von Zell-Zell-Adhäsionen	12
1.3.2	Struktur und Funktion von Zell-Matrix-Adhäsionen	20
1.4	Mechanosensorik und Signaltransduktion in Zellen	22
1.5	Zielsetzung	24
2	Material und Methoden	27
2.1	Materialliste	27
2.1.1	Geräte	27
2.1.2	Software	28
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.4	Chemikalien	30
2.1.5	Zusammensetzung von Puffern und Lösungen	32
2.1.5.1	Zusammensetzung des Zellkulturmediums für Zellen mit mutierten Keratinnetzwerken und die entsprechenden Kontrollzellen	34
2.1.5.2	Zusammensetzung des Zellkulturmediums für Zellen mit mutierten Adhäsionsstrukturen und die entsprechenden Kontrollzellen	35

2.1.5.3	Zusammensetzung des Zellkulturbediums für Zellen mit reduzierter Plectinexpression sowie die entsprechenden Kontrollzellen	36
2.1.6	Antikörper und Farbstoffe	37
2.2	Generierung und Kultivierung der verwendeten Zellen	38
2.2.1	Zellen mit mutiertem Keratinnetzwerk sowie die entsprechenden Kontrollzellen	38
2.2.2	Zellen mit mutierten Adhäsionsstrukturen sowie die entsprechenden Kontrollzellen	39
2.2.3	Zellen mit reduzierter Plectinexpression sowie die entsprechende Kontrollzellen	40
2.2.4	Passagieren der Zellen	40
2.2.5	Kryokonservierung der Zellen	40
2.2.6	Einbringung von siRNA in Zellen mittels fusogener Liposomen . .	41
2.3	Substrate zur Kultivierung von Zellen	42
2.4	Durchführung immunzytochemischer Färbungen	43
2.5	Mikroskope und Geräte	44
2.5.1	Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie	44
2.5.2	Aufbau eines konfokalen Mikroskops	45
2.5.3	Aufbau und Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops	46
2.5.3.1	Durchführung kraftspektroskopischer Messungen	48
2.5.3.2	Das Hertzmodell zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls .	49
2.6	Analyse zellulärer Adhäsionen	50
2.6.1	Einfluss von Substratelastizität und -beschichtung auf das Zytoskelett von Keratinozyten	50
2.6.2	Veränderung der Koloalisation von Paxillin und Vinculin unter Kalziumeinfluss	51
2.6.3	Analyse von Fokaladhäsionen unter Kalziumeinfluss	53
2.6.4	Analyse des Aktinnetzwerkes unter Kalziumeinfluss	53

2.6.5	Korrelationsanalysen von membranständigen desmosomalen Strukturen und zytoskelettalen Keratinaggregaten	54
2.7	Analyse der Aktinreorientierung nach zyklischer Dehnung	56
2.8	Analyse zellulärer Kräfte	61
2.9	Kraftspektroskopische Messungen an lebenden Zellen	64
2.10	Statistische Analysen	68
3	Ergebnisse	69
3.1	Zellkraft- und Zellelastizitätsmessungen an plectinreduzierten Zellen	69
3.1.1	Analyse der Zellkraft von plectinreduzierten Zellen	69
3.1.2	Analyse der Zellelastizität von plectinreduzierten Zellen	73
3.2	Einfluss veränderter Keratinnetze auf die Desmosomenlokalisation und die mechanischen Eigenschaften von Zellen	76
3.2.1	Modifikation der Desmosomenlokalisation durch K14R131P-Mutation	78
3.2.2	Einfluss der K14R131P-Mutation auf die Zellelastizität	81
3.2.3	Vergleich der Integrität von Zellschichten mit veränderten Keratinnetzen	86
3.3	Analyse der Adhäsionsstrukturen und der Zytoskelettorganisation unter dem Einfluss von Kalzium und zyklischer Dehnung	89
3.4	Auswirkungen von Kalzium auf die Organisation des Zytoskeletts und auf Adhärenzverbindungen	91
3.5	Kalziuminduzierte Veränderungen der Aktinfaserreorientierung	96
3.6	Lokalisation von Adhäsionsstrukturen und Aktinfilamenten unter dem Einfluss von Kalzium und zyklischer Dehnung	97
3.7	Kalziuminduzierte Veränderungen der Aktinfaserreorientierung in vinculinfreien Zellen	101
3.8	Untersuchung der Aktinfaserreorientierung in einzelnen Zellen und in konfluenten Zellschichten	102
3.9	Einfluss der E-Cadherin-Deletion auf die Aktinfaserreorientierung	105
3.10	Ausbildung von Zell-Zell-Adhäsionen in E-Cadherin-freien Zellen	107

3.11 Auswirkungen der P-Cadherin-Reduzierung auf die Aktinfaserreorientierung in E-Cadherin-freien Zellen	111
3.12 Einfluss der α -Catenin-Reduzierung auf die Aktinfaserreorientierung . . .	112
3.13 Vergleich der maximalen Aktinfaserreorientierung in VincCtrl- und VincKO-Zellen	115
3.14 Einfluss von Kalzium auf die maximale Aktinfaserreorientierung	120
4 Diskussion	125
4.1 Einfluss der Plectinreduzierung auf die mechanischen Eigenschaften von Zellen	125
4.2 Auswirkungen der K14R131P-Mutation auf die Keratinnetzwerkorganisation sowie die Desmosomenlokalisation	127
4.3 Einfluss der K14R131P-Mutation auf die Zellelastizität	129
4.4 Einfluss veränderter Keratinnetzwerke auf die Integrität von Zellschichten .	131
4.5 Lokalisation von Aktinfilamenten und Adhäsionsstrukturen in Abhängigkeit von Kalzium	134
4.6 Veränderung der Aktinfaserreorientierung durch Einfluss von Kalzium . . .	135
4.7 Veränderung der maximalen Aktinfaserausrichtung infolge der Ausbildung von kalziumabhängigen Adhärenzverbindungen	138
5 Ausblick	141
Erratum	145
Literaturverzeichnis	147
Danksagung	163

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α CatKD	Keratinozyten mit reduzierter α -Cateninexpression
μ g	Mikrogramm
μ m ²	Quadratmikrometer
AJ	Adherens Junction
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalziumion
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure, englisch: <i>Desoxyribonucleic acid</i>
EBS	Epidermolysis bullosa simplex
ECadCtrl	Kontrollkeratinozyten mit nicht mutierten Adhärenzverbindungen
ECadKO	E-Cadherinfreie Zellen
ECadKOPCadKD	E-Cadherinfreie, P-Cadherinreduzierte Zellen
FA	Fokaladhäsion
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
Hz	Hertz
kDa	Kilodalton

...Fortsetzung der Tabelle

kPa	Kilopascal
KTyIWT	Kontrollkeratinozyten mit nicht mutiertem Keratinnetzwerk
KTyI-/-	Keratinfreie Keratinozyten
KTyI-/-K14	Keratinfreie Keratinozyten, welche Keratin 14 exprimieren
KTyI-/- K14R131P	Keratinfreie Keratinozyten, welche Keratin 14R131P exprimieren
LSM	Laser-Scanning Mikroskop
mg	Milligramm
mHz	Millihertz
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mm	Millimeter
n	Anzahl der Messungen
NA	Numerische Apertur
nm	Nanometer
nM	Nanomol pro Liter
nN	Nanonewton
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pN	Piconewton
RNA	Ribonucleinsäure, englisch: <i>Ribonucleic acid</i>

...Fortsetzung der Tabelle

VincCtrl	Kontrollkeratinozyten
VincKO	Vinculinfreie Zellen

1 Einleitung

Die menschliche Haut stellt mit ca. 2 m^2 und einer Dicke von 1 bis 4 mm das größte und zugleich wichtigste Organ bei der Abwehr von externen Einflüssen dar. Sie ist täglich einer Vielzahl von chemischen, biologischen, thermischen sowie mechanischen Belastungen ausgesetzt. Die Zellen der Haut bilden ein mehrschichtiges Epithel und sind durch die Ausbildung eines intrazellulären Zytoskeletts maßgeblich an der Aufrechterhaltung einer intakten Schutzfunktion beteiligt. Das Zytoskelett besteht aus den drei Hauptkomponenten Mikrofilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten, welche mit einer Vielzahl von weiteren Proteinen assoziiert sind (siehe Abbildung 1).

Obwohl bereits bekannt ist, dass Störungen und Mutationen der Intermediärfilamente die Zell- und Gewebefragilität beeinflussen und schwerwiegende Krankheiten auslösen können, ist der Einfluss dieser Filamente auf die mechanischen Eigenschaften von Zellen bislang nur unzureichend analysiert. Die in dieser Arbeit beschriebenen vergleichenden Untersuchungen von keratinfreien und nicht mutierten Kontroll-Keratinocyten ermöglichen eine detaillierte Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften des Intermediärfilamentnetzwerkes. Neben einem intakten Zytoskelett sind der Zusammenhalt der Zellen und die Ausbildung von Adhäsionsstrukturen für die Schutzfunktion der Haut von essentieller Bedeutung. Die interzellulären Verbindungen werden über cadherinbasierte Adhäsionsstrukturen aufgebaut. Aktinassoziierte Adhäsionsverbindungen werden hierbei über Adherens Junctions generiert, keratinvermittelte Adhärenzverbindungen über Desmosomen. Die Ausbildung dieser Strukturen kann die mechanischen Eigenschaften der Zellen verändern, weshalb in dieser Arbeit zur Annäherung an physiologische Bedingungen neben Einzelzellanalysen auch vergleichende Analysen von Zellschichten mit verschiedenen genetischen Hintergründen im Fokus stehen.

1.1 Aufbau, Funktion und epidermale Differenzierung der Haut

Als äußere Schutzschicht ist die Haut in ständigem Kontakt und Austausch mit ihrer Umgebung. Die Regulierung des Wasser- und Elektrolythaushalts, die Wärmeregulierung und der Stoffaustausch sowie der Schutz vor mechanischen Reizen sind hierbei nur einige

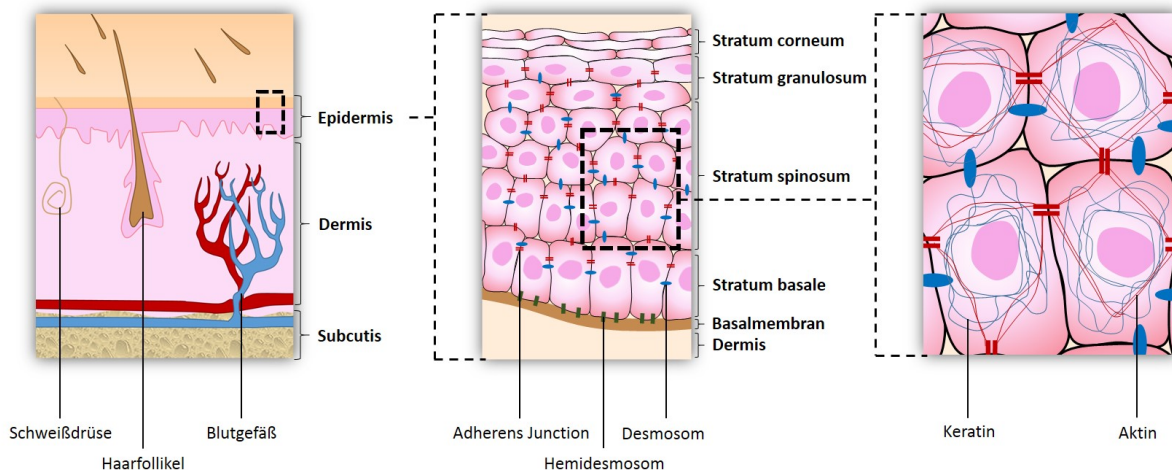


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Epidermis. Die Haut kann in die drei Schichten Subcutis, Dermis und Epidermis unterteilt werden, wobei die Epidermis selbst wiederum in vier Schichten gegliedert wird und überwiegend aus Keratinozyten aufgebaut ist.

ihrer zahlreichen Aufgaben [1]. Histologisch kann die Haut in drei Schichten eingeteilt werden. Die unterste Hautschicht, die Subcutis (Unterhaut), ist aus Fibroblasten, Makrophagen und subkutanen Fettzellen aufgebaut und dient der Speicherung von Wärme sowie Energiereserven. In die darüber liegende Schicht, die Dermis (Lederhaut) sind Blutgefäße, Schweiß- und Talgdrüsen sowie Haarfollikel eingelagert. Ihre Hauptaufgabe ist die Versorgung der ihr aufgelagerten Epidermis. Als oberste Schicht übernimmt die Epidermis (Oberhaut) Barriere- und Schutzfunktionen. Sie ist aus einem mehrschichtigen verhornten Plattenepithel aufgebaut und besitzt keine Blutgefäße, weshalb sie von der Dermis versorgt werden muss. Mit über 90% der Zellen bilden Keratinozyten den Hauptbestandteil der Oberhaut (siehe Abbildung 1) [2].

Während der epidermalen Differenzierung durchwandern diese Zellen die Epidermis, welche aufgrund des Differenzierungsgrades der Zellen in vier Schichten unterteilt werden kann (siehe Abbildung 2) [2]. Das Stratum basale, die innerste Schicht (Basalschicht), bildet den Ausgangspunkt für die Neubildung und Proliferation von Zellen. Die Keratinozyten entstehen hierbei durch Teilung mitotisch aktiver, epidermaler Stammzellen. In dieser Schicht sind die Zellen zylinderförmig, gleichmäßig angeordnet und mittels Hemidesmosomen an der darunter liegenden Basalmembran verankert. Von hier aus beginnen die Keratinozyten ihre Migration in Richtung Hautoberfläche. Mit Verlassen der Basalschicht verlieren sie ihre Teilungsfähigkeit und ein Umbau der Zellen beginnt, welcher sich durch eine Volumenzunahme äußert. Im Stratum spinosum, der Stachelzellschicht,

sind die Zellen über interzelluläre Verbindungen miteinander assoziiert, was ihnen ein stachelartiges Aussehen verleiht. In der nächsten Schicht, dem Stratum granulosum, wird das Innere der Zellen von Keratingranular dominiert. Der Umbau- und Verhornungsprozess nimmt immer weiter zu, bis die Zellen abgestorben und vollständig verhornt sind. Diese Zellen, die sogenannten Korneozyten, enthalten keinerlei Zellorganellen mehr und bilden die äußerste Schicht, das Stratum corneum (Hornschicht) [2] [3] (siehe Abbildung 2).

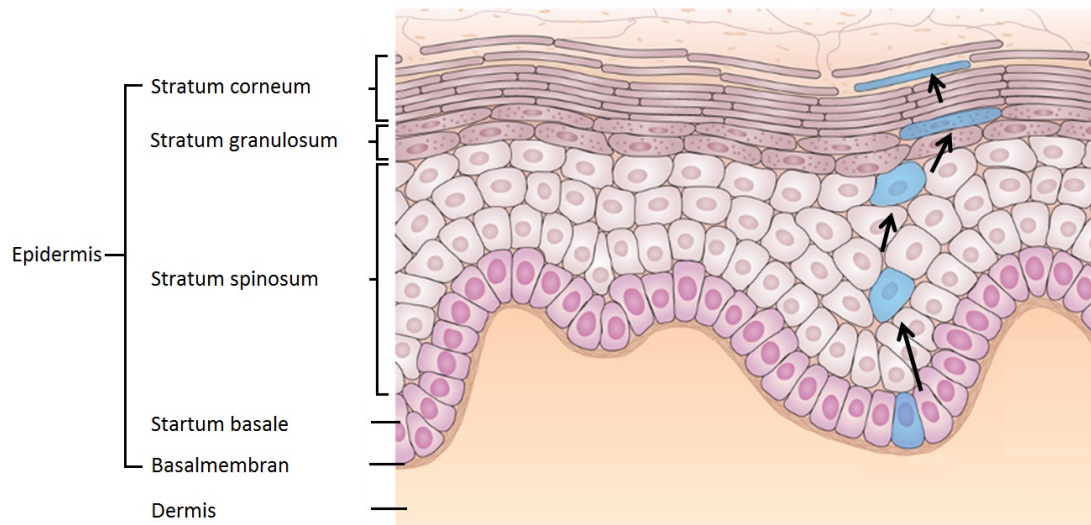


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Haut. Die Abbildung zeigt die beiden Hautschichten Dermis und Epidermis. Die Epidermis kann aufgrund des Differenzierungszustandes der Zellen in vier Schichten unterteilt werden. Die blau gefärbten Zellen skizzieren die Migration einer Keratinozyte, welche während ihrer Differenzierung die verschiedenen Hautschichten durchläuft. Verändert nach [4].

Proliferation, Differenzierung und Apoptose sind während der epidermalen Differenzierung sowohl räumlich als auch zeitlich genau kontrolliert und durch die Expression spezifischer Proteine charakterisiert [2]. Differenzierungsprozesse werden hierbei durch die Kalziumionenkonzentrationen in der Epidermis reguliert. Die Konzentrationen variieren zwischen den verschiedenen Schichten, was zur Ausbildung eines intraepidermalen Kalziumgradienten führt. Hautkrankheiten, wie Psoriasis oder Plattenepithelkarzinome, welche auf eine gestörte epidermale Differenzierung zurückzuführen sind, zeigen die große Bedeutung einer präzisen Kontrolle der kalziumabhängigen Differenzierungsvorgänge [5] [6]. Die Kalziumkonzentration ist im promitotischen Stratum basale am geringsten und steigt zu den antimitotischen, oberen Schichten des Stratum granulosum hin an. Aufgrund der kalziumabhängigen Differenzierung können Proliferations- und Differenzierungsraten der Keratinozyten auch *in vitro* durch die Kalziumkonzentration im Medium reguliert werden. In

vitro weisen die Zellen bei einer geringen Kalziumkonzentration von weniger als 0,05 mM eine hohe Proliferationsrate, interzelluläre Zwischenräume und kaum interzelluläre Kontakte auf [7]. Eine Erhöhung der Kalziumkonzentration auf über 1,0 mM führt *in vitro* zu einer Umverteilung von Adhäsionsproteinen, welche aus dem Zytoplasma zur Zellmembran translozieren. Zudem bilden sich innerhalb von zwei Stunden interzelluläre Kontakte aus, welche das Zytoskelett benachbarter Zellen miteinander verbinden [7] [8].

1.2 Zusammensetzung und Funktion des Zytoskeletts

Beim Zytoskelett handelt es sich um ein aus Proteinen aufgebautes, intrazelluläres Netzwerk, welches für die Formgebung der Zelle, ihre mechanische Stabilität sowie ihre elastischen Eigenschaften verantwortlich ist. Zudem ist es an der Zellmigration, intrazellulären Transportmechanismen sowie der Zellteilung beteiligt. Die zytoskelettalen Proteine bilden ein dynamisches Netzwerk, welches durch Selbstorganisation flexibel auf- und abgebaut werden kann. Hierbei kann das Zytoskelett in die drei Fasersysteme Mikrofilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli unterteilt werden. Mikrotubuli sind gerichtete, röhrenförmige Proteinfilamente, welche aus α - und β -Tubulin Dimeren bestehen und einen Durchmesser von 15-25 nm aufweisen. Sie durchlaufen permanent Poly- und Depolymerisationsprozesse, wobei die Polymerisation am Plusende schneller verläuft. Ihr Minusende ist an ein Mikrotubuli organisierendes Zentrum gebunden. Es sind zahlreiche Mikrotubuli-assoziierte Proteine beschrieben, von denen die Motorproteine Dynein und Kinesin zu den bekanntesten zählen. Neben dem Stofftransport haben die Mikrotubuli eine Stützfunktion und bilden den Spindelapparat zur Trennung der Chromosomen während der Zellteilung.

1.2.1 Aufbau und Funktion von Intermediärfilamenten

Im Gegensatz zu Mikrotubuli und Mikrofilamenten besitzen die Intermediärfilamente (IF) keine Polarität und bislang sind keine intermediärfilamentassoziierten Motorproteine bekannt. Ihr Name leitet sich von ihrem Durchmesser ab, welcher mit 8 - 12 nm zwischen dem der Mikrofilamente (7 nm) und dem der Mikrotubuli (15 - 25 nm) liegt. Die Hauptaufgabe der Intermediärfilamente besteht in der Ausbildung eines stabilen zytoskelettalen

Gerüsts, welches die Integrität des Gewebes und gleichzeitig eine schnelle Adaptation an intrazelluläre Prozesse und externe Reize gewährleistet [9]. Mit über 70 Genen, welche für Intermediärfilamente kodieren, zählt die Genfamilie der Intermediärfilamente zu einer der größten des humanen Genoms [10]. Durch die Translation von mindestens 74 funktionellen Proteinen wird eine hohe Diversität und eine große Varianz in der Größe der Intermediärfilamente von 40 - 240 kDa erreicht [11]. Anhand ihrer Struktur und Gewebeverteilung werden die Intermediärfilamente in sechs Typen unterteilt. Die 28 sauren Typ I und die 26 basischen Typ II-Intermediärfilamente zählen beide zu den epithelialen Intermediärfilamenten und bilden gemeinsam die Gruppe der Keratine. Da sich diese Arbeit im Weiteren mit der detaillierten Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften und Funktionen von Keratinen beschäftigt, wird der Aufbau von Intermediärfilamenten exemplarisch am Beispiel der Keratine im Folgenden näher beschrieben.

1.2.1.1 Zusammenlagerung und Expression von Keratinen

Keratine sind auf zwei Gencluster aufgeteilt. Die sauren Typ I Keratine 9-28 sowie die Keratine 31-40 sind im ersten Gencluster auf dem murinen Chromosom 11 lokalisiert, die basischen Typ II Keratine 1-8, die Keratine 71-74 sowie die Keratine 81-86 sind in einem zweiten Gencluster auf dem Chromosom 15 lokalisiert [12]. Der Aufbau von Keratinfilamenten erfolgt aus Heterodimeren, welche sich jeweils aus einem sauren und einem basischen Keratin zusammensetzen. Obwohl Intermediärfilamente insgesamt sehr heterogen in Größe, Primärstruktur und Regulation sind, ist ihnen allen eine zentrale, hoch konservierte alpha-helikale „Rod“-Domäne gemein, welche am N-terminalen Kopf- sowie am C-terminalen Schwanzende von einer nicht helikalen Domäne flankiert wird. Die zentrale alpha-helikale Domäne beinhaltet ein sich wiederholendes „heptad“-Motiv, welches an bestimmten Stellen von drei kurzen, hoch konservierten Linkersequenzen L1, L12 und L2 unterbrochen ist (siehe Abbildung 3). Die flankierenden Endbereiche sind sehr variabel und spielen bei der Zusammenlagerung, Organisation und Regulation von Intermediärfilamenten eine entscheidende Rolle.

Durch die zahlreichen posttranslationalen Modifikationsstellen in der Kopf- und Schwanzdomäne sowie die Interaktion mit anderen Proteinen in diesen Bereichen erlangen die unterschiedlichen Keratine ihre spezifischen Eigenschaften und die hohe funktionelle Diversität der verschiedenen Keratinpaare [14] [15] [16] [17]. Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung oder Ubiquitinierung regulieren die Eigenschaften der

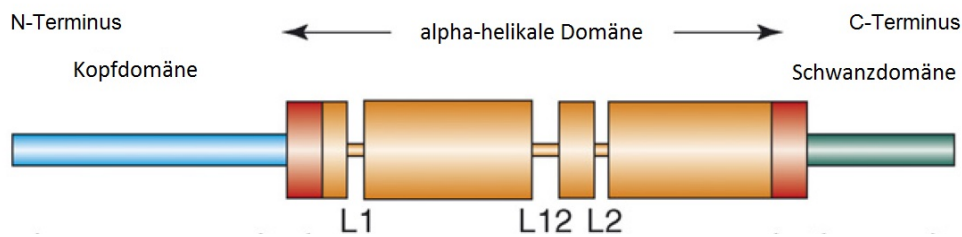


Abbildung 3: Strukturelle Gliederung von Intermediärfilamenten. Die schematische Darstellung eines Intermediärfilamentes zeigt die zentrale alpha-helikale Domäne, welche von den drei Linkersequenzen L1, L12 und L2 unterbrochen ist und von einer nicht helikalen Kopf- und Schwanzdomäne flankiert wird. Verändert nach [13].

Keratine isotypspezifisch und können die Organisation des gesamten Keratinnetzwerkes, seinen Auf- bzw. Abbau sowie die Interaktion mit Adhärenzstrukturen und assoziierten Proteinen beeinflussen [15].

Die zentrale alpha-helikale „Rod“-Domäne vermittelt die Selbstassemblierung zweier Keratin-Monomere zu einem stabilen coiled-coil Dimer [18]. Bei der Assemblierung von Keratinfilamenten kommt es hierbei durch die laterale Anlagerung eines sauren Typ I und eines basischen Typ II Keratins zur Bildung von Heterodimeren. Durch laterale, anti-parallele Anlagerung zweier Heterodimere entstehen im nächsten Schritt apolare Tetramere, welche sich wiederum zu acht zusammenlagern und Protofibrillen ausbilden. Diese höher geordneten Oligomere besitzen eine Länge von ca. 60 nm und einen Durchmesser von ca. 16 nm und werden als sogenannte Einheitslängensfilamente (englisch: *unit length filaments*) bezeichnet. Durch longitudinale Anordnung mehrerer Einheitslängensfilamente entstehen Strukturen mit einer Länge von mehreren 100 nm. Intrafilamentöse Umstrukturierungen führen zu einer radialen Kompaktion und damit einhergehend zu einer Verringerung des Filamentdurchmessers auf 10-12 nm [19] (siehe Abbildung 4).

Das Expressionsmuster der Keratine sowie die Zusammensetzung der Keratinpaare gibt Aufschluss über den Differenzierungsgrad der Zellen *in vivo* und ist spezifisch für die verschiedenen Hautschichten. Während der migrativen Differenzierungsprozesse der Keratinozyten verändert sich das Expressionsprofil von Zytokeratinen mit einer geringen Masse von 46-58 kDa in basalen Schichten hin zu größeren Keratinen, mit einer Masse von 63-67 kDa, in apikalen Schichten. Auch der Anteil von Keratin an der Gesamtproteinmenge steigt hierbei von anfänglichen 30% auf 85% in apikalen Schichten an [20] [21]. Die Zusammensetzung der Keratinpaare unterscheidet sich in den unterschiedlichen Gewebe-

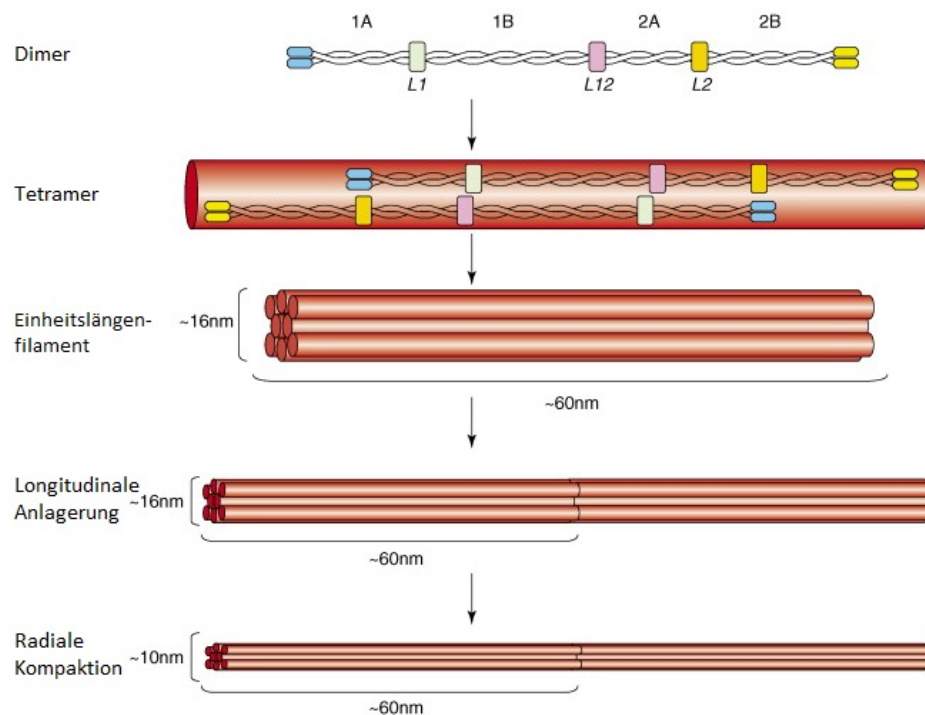


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zusammenlagerung von Intermediärfilamenten. Durch die antiparallele Anlagerung zweier Intermediärfilamentdimere entstehen Tetramere, welche sich zu Einheitslängen-Filamenten zusammenlagern und durch longitudinale Anlagerung weiterer Filamente Intermediärfilamente bilden. Verändert nach [10].

schichten. Basale Schichten der Epidermis exprimieren die Keratine 5, 14 und 15, welche während der Differenzierung in höheren Schichten durch die Keratine 1 und 10 ersetzt werden [21]. Das Expressionsmuster wird durch Wundheilungs- und Regenerationsprozesse unterbrochen. Diese Prozesse erfordern eine stärkere Proliferation und Migration der Zellen, was eine Aufhebung der Zell-Zell-Kontakte voraussetzt. In diesem Fall wird die Expression der suprabasalen Keratine 1 und 10 deutlich reduziert, während die Keratine 6, 16 und 17 hochreguliert werden [22].

1.2.1.2 Der Keratin-Zyklus: Nukleation, Elongation, Integration und Reifung

Um eine hohe Widerstandsfähigkeit zu erlangen und gleichzeitig flexibel und dynamisch zu bleiben, ist das Keratinnetzwerk nicht statisch, sondern unterliegt ständigen Umbauprozessen und einer permanenten Fluktuation, welche als Keratin-Zyklus beschrieben werden [9]. Die Umbauprozesse werden durch zwei Prozesse bewerkstelligt. Zum einen werden Teile des bestehenden Keratinnetzwerkes vollständig degradiert und durch den Einbau neu

synthetisierter Filamente ersetzt, zum anderen lösen sich Keratinoligomere aus dem Netzwerk und stehen in peripheren Bereichen für den Wiedereinbau zur Verfügung. Der genaue Mechanismus ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird jedoch vermutet, dass der Keratin-Zyklus eine Kombination dieser beiden Prozesse ist, wobei die energetisch günstigere Umlagerung von Keratinpartikeln hierbei bevorzugt wird [9] [23].

Der Keratin-Zyklus beginnt mit der Nukleation von Keratinpartikeln in der Zellperipherie, häufig in der Nähe von Fokaladhäsionen [24]. Während einer stetigen, aktinabhängigen, zentripetalen Translokation dieser Partikel erfolgt ihre Elongation. Aufgrund der Apolarität der Filamente erfolgt die Elongation zeitgleich an beiden Filamentenden [23]. Erreichen die Keratinfilamente das bereits bestehende Keratinnetzwerk, so werden sie als weitere Verzweigung in das periphere Keratinnetzwerk integriert. Während der anhaltenden zentripetalen Translokation werden sie immer stärker gebündelt, was zu einer Erhöhung der Stabilität und einer Reduzierung der Fluktuation führt. Hierbei reifen sie und bilden ein dichtes, stabiles Netzwerk aus, welches den Zellkern umgibt. Zusätzliche Stabilität erlangen sie durch die Verankerung in Adhäsionsstrukturen wie Desmosomen oder Hemidesmosomen.

Ein Teil der Keratinpartikel verlässt den Zyklus, bevor er die Reifung zu stabilen Keratinfilamenten erfährt. Die Partikel lösen sich aus dem Netzwerk und zerfallen zu löslichen Oligomeren, welche für die Nukleation in der Zellperipherie erneut zur Verfügung stehen (siehe Abbildung 5). Durch diese Wiederverwertung wird gewährleistet, dass ohne den Energieaufwand einer aufwändigen Neu-Biosynthese stets ausreichend Keratinpartikel für die dynamischen Prozesse des flexiblen und zugleich stabilen Keratinnetzwerkes zur Verfügung stehen [23]. Eine weitere Möglichkeit zur Umstrukturierung des Keratinnetzwerkes ist die vollständige Degradierung der Keratin-Polypeptide, bei welcher die Filamente nach Ubiquitinierung proteosomal degradiert werden und eine anschließende Neusynthese der Filamente erfolgt [25].

Die aktinabhängige Translokation der Keratinfilamente während des Keratinzyklus ist vermutlich auf die Anwesenheit von filamentübergreifenden Adapterproteinen zurückzuführen. Diese Strukturen sind besonders bei der Positionierung und Organisation des Zytoskeletts von Bedeutung [26]. Sie verbinden die Filamente des Zytoskeletts untereinander und verknüpfen sie mit Adhäsionsstrukturen. Das Protein Plectin

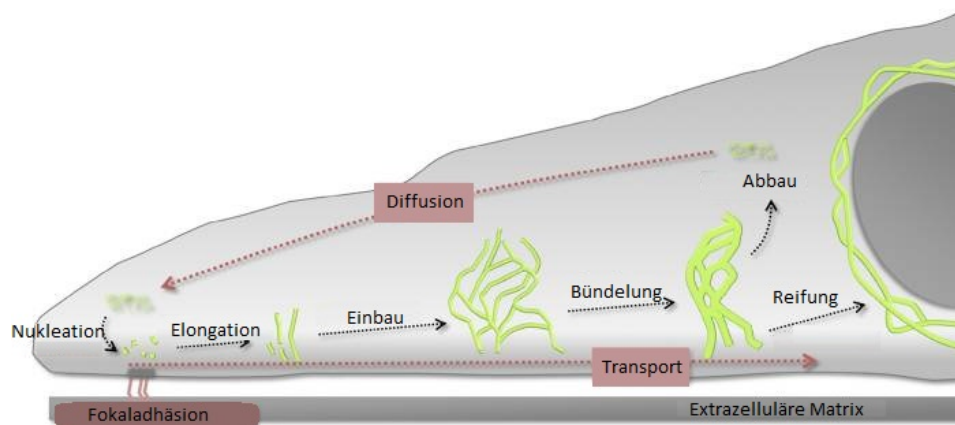


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Keratinzyklus. Der Keratinzyklus beginnt mit der Nukleation von Keratinfilamenten in der Nähe von Fokaladhäsionen. Es folgen die Elongation und der Einbau der Filamente in das bereits bestehende Keratinnetzwerk. Nach der Bündelung erfolgt die Reifung der Filamente die mit ihrer radialen Kompaktion einhergeht, oder der Abbau der Filamente. Nach dem Abbau stehen die Keratinpartikel für eine erneute Nukleation in der Zellperipherie zur Verfügung. Verändert nach [23].

ist mit Intermediärfilamenten assoziiert und verbindet diese mit anderen zytoskelettalen Komponenten [26]. Plectin kommt im Zytoplasma fast aller eukaryotischen Zellen vor und ist an der Keratinfilamentbündelung, der Keratinfilamentverzweigung und der Verknüpfung des Keratinnetzwerkes mit hemidesmosomalen Integrinen beteiligt [27] [28] [29]. Der Verlust von Plectin kann zu schweren Krankheiten wie Epidermolysis bullosa simplex führen, welche durch die fehlende Verbindung zwischen dem Keratinnetzwerk und den Adhäsionsstrukturen hervorgerufen wird [30].

1.2.2 Aufbau und Funktion von Mikrofilamenten

Mikrofilamente werden aus dem Strukturprotein Aktin aufgebaut und dienen der Stabilisierung und Formgebung der Zelle. Die Aktinfasern bilden ein dreidimensionales, die Zelle durchspannendes Netzwerk mit einem Filamentdurchmesser von 7 nm. Hierbei handelt es sich um flexible, doppel-helikale Strukturen, welche aus globulären Aktinmonomeren (G-Aktin) aufgebaut sind, die sich durch adenosintriphosphatabhängige Polymerisation zu filamentösem Aktin (F-Aktin) zusammenlagern. Die Mikrofilamente weisen eine Orientierung auf, da die Polymerisierung von globulärem Aktin zwar an beiden Enden gleichzeitig ablaufen kann, jedoch mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. So polymerisiert

das schnell wachsende Plusende mit einer höheren Geschwindigkeit als das langsamer wachsende Minusende.

Unterhalb der Plasmamembran bilden Aktinfilamente ein dichtes, dreidimensionales Gerüst, das sogenannte kortikale Aktin. Dieses wird über Verbindungsproteine wie Filamin zu einem stabilen Netzwerk verknüpft und dient dazu, Transmembranproteine an bestimmten Positionen zu lokalisieren. Über Myosine werden Kurzstreckentransporte von Vesikeln entlang der Aktinfilamente bewerkstelligt. Die Bündelung von 10-30 Aktinfilamenten führt zur Bildung von Stressfasern [31] [32] (siehe Abbildung 6).

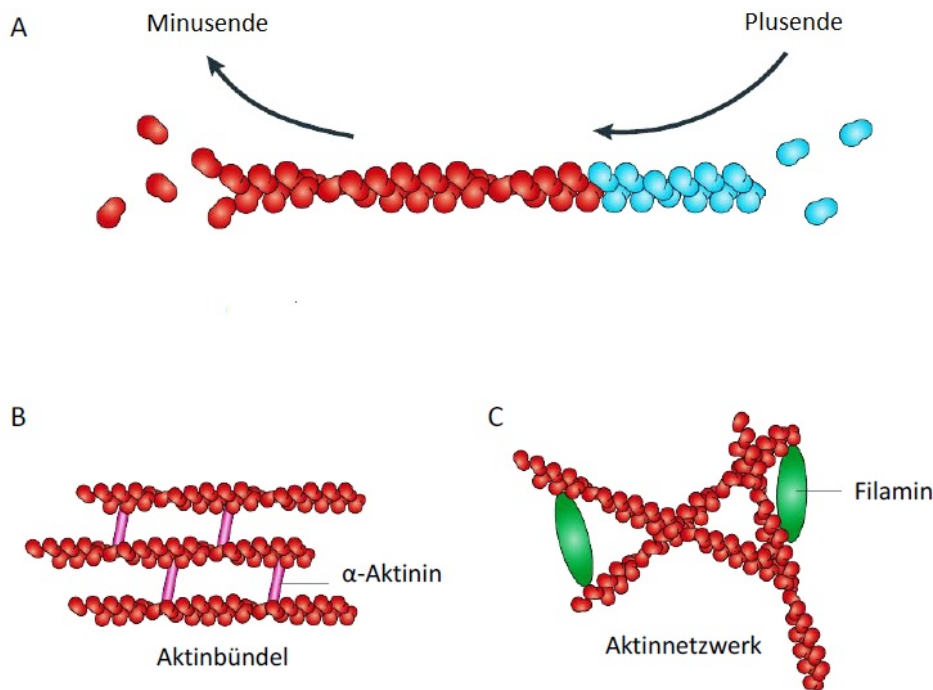


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Aktinpolymerisation und -netzwerkbildung. (A) Globuläres Aktin polymerisiert zu filamentösem Aktin. Am Plusende verläuft die Polymerisierung, am Minusende die Depolymerisierung schneller. (B) Bildung von Stressfasern durch die Verknüpfung mehrerer Aktinfasern über Proteine wie beispielsweise α -Actinin. (C) Verknüpfung von Aktinfasern durch Filamin und andere Proteine führt zur Bildung des kortikalen Aktinnetzwerkes. Verändert nach [33].

Durch die Anlagerung von weiteren Proteinen wie α -Actinin, Fascin oder Filamin kommt es zur Kreuzvernetzung der Filamente. Myosin und α -Actinin zeigen eine periodische Verteilung entlang der gesamten Stressfaser [34], wie sie auch in anderen kontraktile Strukturen beobachtet werden kann. Myosin ist aus einer Schwanzdomäne und einer globulären

Kopfdomäne aufgebaut. Die Kopfdomäne weist Bindestellen für Adenosintriphosphat und Aktin auf und ist im 90° Winkel zur Schwanzdomäne ausgerichtet. Durch Hydrolyse von Adenosintriphosphat zu Adenosindiphosphat und Phosphat und der anschließenden Freisetzung dieser Substanzen, kommt es zu einer Konformationsänderung des Myosinkopfes. Dieser richtet sich hierbei in einer Art Schlagbewegung im 45° Winkel zur Schwanzdomäne aus. Über diesen sogenannten Querbrückenzyklus ist Myosin in der Lage, sich relativ gegen Aktin zu bewegen, was durch die Bindung der Myosinköpfe an Aktinfilamente in einer Verschiebung der antiparallel gerichteten Aktinfasern und einer Kontraktion der Stressfasern resultiert. Die antiparallele Anordnung der Aktinfilamente ist hierbei Voraussetzung für den kontraktile Mechanismus. Neben den antiparallel angeordneten Fasern werden jedoch auch gestaffelte und parallele Konformationen beschrieben [35].

Die Stressfasern werden anhand ihrer Lage innerhalb der Zelle in drei Klassen eingeteilt [36]. Die transversalen Bögen sind nicht mit Fokaladhäsionen assoziiert und verlaufen bogenförmig, parallel zur Lamelle. Die dorsalen Stressfasern verlaufen von der Lamelle ins Zellinnere. Sie sind an einem Ende an eine Fokaladhäsion gebunden, während das andere Ende frei ins Zytoplasma ragt und sich dort verzweigt. Die ventralen Stressfasern sind die häufigste Faserform. Sie durchspannen die gesamte Zelle und sind an beiden Enden mit Fokaladhäsionen assoziiert, weshalb sie besonders für die Zelladhäsion und Kontraktion von Bedeutung sind [37].

1.3 Zelluläre Adhäsionen

Die zelluläre Adhäsion ist die Voraussetzung für die Entstehung multizellulärer Organismen und entscheidend für die Aufrechterhaltung der mannigfaltigen Funktionen der Haut. Sie ist bei der Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen von großer Bedeutung. Der Auf- und Abbau von Adhärenzverbindungen ist während der Differenzierung der Zellen oder der Wundheilung ein ständiger, dynamischer Prozess, welcher präzise kontrolliert und reguliert werden muss, da Defekte durch Adhärenz Junctions vermittelte Zell-Zell-Kontakte zu Hyperproliferation und Krebs, Störungen desmosomaler Strukturen zu degenerativen Krankheiten wie ektodermaler Dysplasie führen können [38]. Die Adhäsionsstrukturen gehen intrazelluläre, filamentspezifische Bindungen ein, welche eine Umstrukturierung des Zytoskeletts und eine Induktion von Signalkaskaden auslösen

können. Man unterscheidet zwischen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionen.

1.3.1 Struktur und Funktion von Zell-Zell-Adhäsionen

An der funktionellen Zusammenlagerung mehrerer Zellen zu einer intakten Zellschicht sind die interzellulären Adhärenzverbindungen Desmosomen und Adherens Junctions (AJ) maßgeblich beteiligt. Diese Strukturen verbinden die verschiedenen Komponenten der Zytoskelette der einzelnen Zellen filamentspezifisch miteinander und regulieren die Morphogenese und Zellpositionierung im epithelialen Gewebe [39]. Die zentralen Proteine der kalziumvermittelten Zell-Zell-Adhäsion sind Cadherine. Ihr Name leitet sich aus dem englischen Begriff für kalziumabhängige Adhäsionsstrukturen (*calcium-dependent cell adhesion*) ab. Die Familie der Cadherine kann in sieben Gruppen eingeteilt werden. Hierbei wird zwischen den klassischen und den desmosomalen Cadherinen sowie den Protocadherinen, den cadherin-ähnlichen Signalproteinen, den Proteinkinase-Cadherinen und den 7-Transmembran-Cadherinen unterschieden. Zu den klassischen Cadherinen zählen E-Cadherin, P-Cadherin, N-Cadherin und VE-Cadherin, die nach ihrem Vorkommen im epithelialen (E-Cadherin), plazentaren (P-Cadherin) bzw. neuronalen (N-Cadherin) und vaskulär-endothelialen (VE-Cadherin) Gewebe benannt wurden.

Klassische Cadherine sind als Homodimer aufgebaut und können als Transmembranproteine in einen extra- und einen intrazellulären Bereich gegliedert werden. Die extrazelluläre Domäne ist bei klassischen Cadherinen aus fünf bis sechs repetitiven Cadherin-Domänen aufgebaut. Zwischen jedem Cadherinpaar sind Kalziumionen lokalisiert, welche die Polypeptidkette stabilisieren und versteifen. Je mehr Kalziumionen gebunden sind, desto steifer wird die Struktur [40]. In Abwesenheit von Kalziumionen wird der extrazelluläre Teil der Cadherine instabil und kann leicht von proteolytischen Enzymen abgebaut werden (siehe Abbildung 7). Die initiale Cadherin-Dimerisierung ist folglich ein kalziumabhängiger Prozess, welcher durch die Kalziumionenkonzentration reguliert wird [41].

Man unterscheidet zwischen den cadherinvermittelten Adhärenzverbindungen Adherens Junctions und Desmosomen. Adherens Junctions sind mit dem Aktinnetzwerk verknüpft, während Desmosomen mit dem IF-Netzwerk assoziiert sind. Beiden gemein ist ein dreigeteilter Aufbau aus einem transmembranen Cadherin, Proteinen der Amadillo-Familie

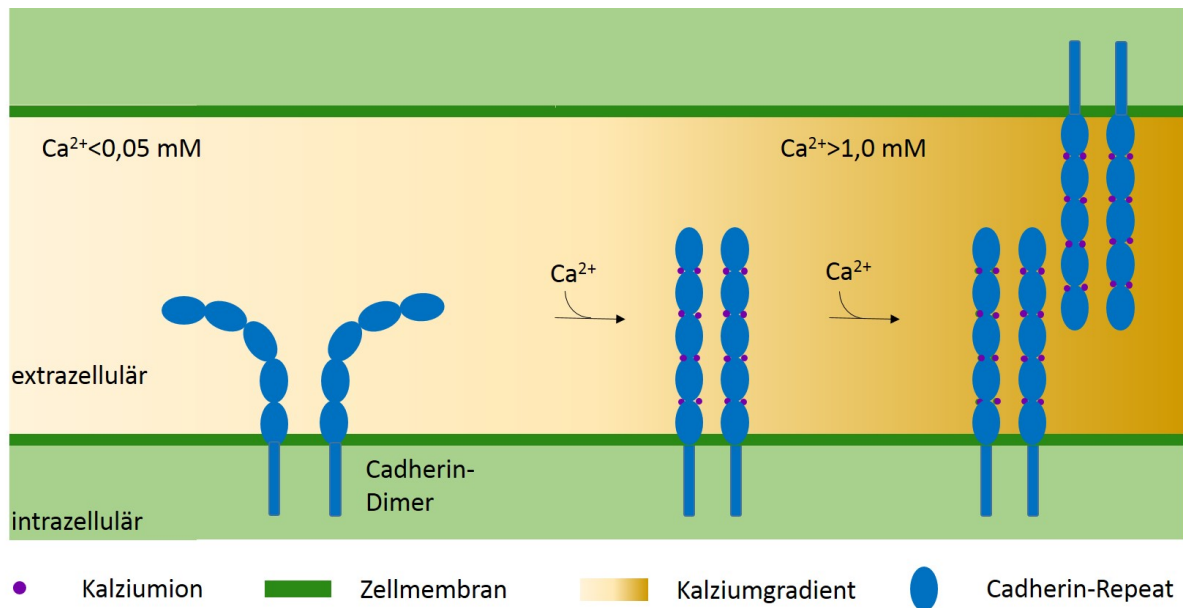


Abbildung 7: Kalziumabhängige Dimerisierung von Cadherinen. Die extrazelluläre Cadherindomäne besteht aus fünf repetitiven Domänen, zwischen welche Kalziumionen anlagern können. Bei Kalziumkonzentrationen unter 0,05 mM steht die extrazelluläre Domäne nicht unter Spannung. Erst durch die Anlagerung von Kalziumionen bei Kalziumkonzentrationen über 1,0 mM versteift die extrazelluläre Domäne und Cadherindimere können ausgebildet werden, welche mit Dimeren benachbarter Zellen assoziieren können. Hierbei kommt es zu einer schwachen Bindung mit einer hohen Kinetik zwischen den extrazellulären Domänen 1-3 von Cadherinen benachbarter Zellen [42] [43].

und zytoskelettalen Adapterproteinen, welche die Adhäsionsstruktur mit dem Zytoskelett verknüpfen. Desmosomen treten als mehrschichtige, symmetrische Strukturen zwischen den lateralen Membranen zweier benachbarter Zellen auf. Ihre Stabilisierung und Lokalisierung in der Zellmembran wird durch die Verbindung mit intrazellulären Keratinfilamenten reguliert [44]. Desmosomen sind aus den transmembranen Cadherinen Desmoglein und Desmocollin aufgebaut, deren N-terminale Enden im interzellulären Spalt die Verbindung zu desmosomalen Strukturen der Nachbarzelle herstellen. Ihr C-Terminus ist im desmosomalen Plaque lokalisiert und stellt die Bindestelle für die Amadilloproteine Plakoglobin und Plakophilin dar. Diese wiederum rekrutieren Desmoplakin, welches den desmosomalen Plaque direkt mit dem IF-Zytoskelett verbindet (siehe Abbildung 8).

Bei desmosomalen Verbindungen handelt es sich um sehr robuste, laterale Verbindungen, welche während der Zellmigration und Differenzierung ständigen dynamischen Umbauprozessen unterliegen. Das Expressionsmuster der Desmogleine und Desmocolline verändert sich bei der epidermalen Differenzierung. In den basalen Schichten werden Desmoglein

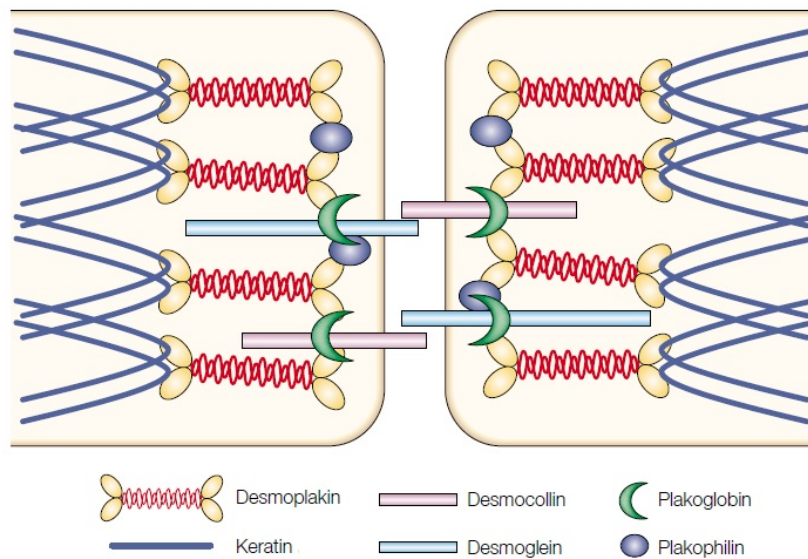


Abbildung 8: Schematische Darstellung von Desmosomen. Die Transmembranproteine Desmocollin und Desmoglein sind die zentralen Bestandteile von Desmosomen. Extrazellulär sind sie mit Desmogleinen und Desmocollinen benachbarter Zellen assoziiert, intrazellulär sind sie an Plakoglobine sowie Plakophilinen gebunden und über Desmoplakine an das Keratinnetzwerk gekoppelt. Verändert nach [45].

2 und 3 sowie Desmocollin 2 und 3 exprimiert, während es in den suprabasalen Schichten vor allem Desmoglein 1 und 4 sowie Desmocollin 1 sind (siehe Abbildung 9) [46] [47]. Dies geht einher mit einem deutlichen Anstieg der Anzahl desmosomaler Verbindungen während der Stratifizierung zur Gewährleistung der Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen Belastungen und externen Reizen.

Die epidermalen Adhäsionsverbindungen Adherens Junctions sind aus den klassischen, transmembranen E- und P-Cadherinen aufgebaut, welche intrazellulär mit zahlreichen Bindungspartnern assoziiert sind. Für diese Adhäsionsverbindungen wird ein dreischichtiger Aufbau beschrieben, welcher sich aus einer signalübertragenden, einer kraftübertragenden und einer aktinregulierenden Schicht zusammensetzt [48]. Als aktinbindendes Protein stellt Vinculin eine wichtige Verbindung zwischen Aktin und transmembranen Integrin sowie Cadherin-Komplexen her. Bei Vinculin handelt es sich um ein 117 kDa großes Strukturprotein, welches 1980 als Protein am distalen Ende von Mikrofilamenten entdeckt wurde [49]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Vinculin sowohl in Fokaladhäsionen als auch in Adherens Junctions lokalisiert ist. [50]. Sein Name leitet sich aus dem lateinischen Wort vinculum ab, was so viel wie Seil oder Fessel bedeutet und seine Aufgabe als Adapterprotein zwischen Transmembranproteinen und dem Aktinnetzwerk

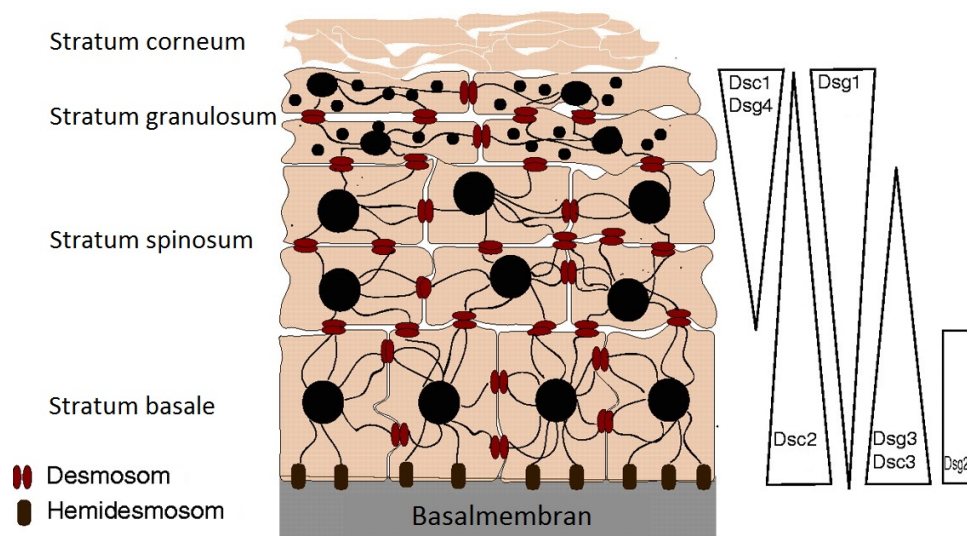


Abbildung 9: Intraepidermale Gradienten desmosomaler Proteine. Die schematische Abbildung zeigt den vierschichtigen Aufbau der Epidermis sowie die Zell-Zell-Adhäsionen über Desmosomen und die Zell-Matrix-Adhäsionen über Hemidesmosomen. Rechts im Bild ist der Gradient der desmosomalen Adhäsionsproteine Desmoglein (Dsg) 1, 2, 3, 4 und Desmocollin (Dsc) 1, 2, 3 dargestellt. Verändert nach [46].

beschreibt. In dieser Funktion ist Vinculin ein zentraler Bestandteil von Fokaladhäsionen und Adhärenzverbindungen wie Adherens Junctions, weshalb es häufig als Marker dieser beiden Adhärenzstrukturen verwendet wird.

Das dreigeteilte Protein kann in eine globuläre Kopfdomäne, ein prolinreiches Verbindungsstück und eine Enddomäne gegliedert werden [51]. An der Kopfdomäne sind zahlreiche Bindestellen für Talin, α -Actinin sowie α -Catenin lokalisiert. Die prolinreiche Region beinhaltet Bindestellen für VASP, Arp2/3 und Vinexin, während die Enddomäne Bindestellen für Aktin, Paxillin und PIP2 aufweist (siehe Abbildung 10). Bakolitsa konnte 2004 zeigen, dass Vinculin in fünf Domänen unterteilt werden kann, von denen die Kopfdomänen 1-3 die Enddomäne 5 in der inaktiven Konformation von Vinculin fest gebunden haben, was zu einer Maskierung zahlreicher Bindestellen führt [52]. Erst eine intrazelluläre Aktivierung führt zu einer Konformationsänderung, wodurch die Bindestellen für verschiedene Proteine freigegeben werden [53]. Während Vinculin in der aufgefalteten Konformation in Fokaladhäsionen lokalisiert ist, verbleibt die gefaltete, intramolekular assoziierte Form im Zytoplasma [54]. Hierbei liegt stets ein intrazelluläres Gleichgewicht aus aktiver und inaktiver Form vor.

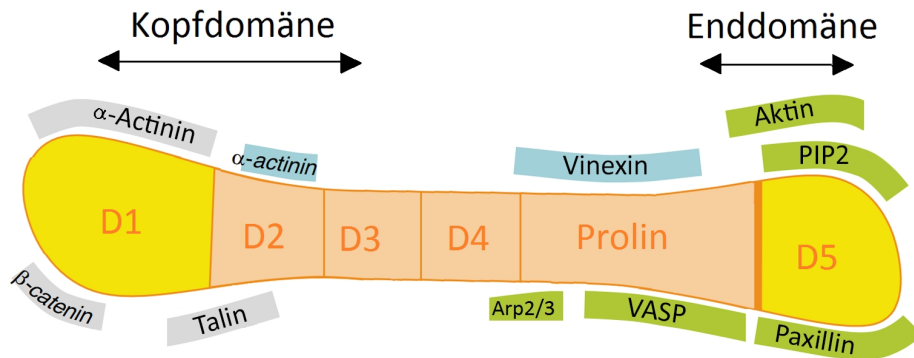


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Proteins Vinculin. Das Protein Vinculin ist in fünf Domänen unterteilt, welche jeweils spezifische Bindestellen für spezielle Proteine aufweisen. Die Kopfdomänen D1-D4 sind über ein prolinreiches Verbindungsstück mit der Enddomäne D5 verbunden. Verändert nach [40].

Die Funktion von Vinculin ist in Fokaladhäsionen und Adherens Junctions vergleichbar und dient der Stabilisierung und Stärkung der Strukturen. Durch die Bindung an Talin (in Fokaladhäsionen) bzw. α -Catenin (in Adhärenzverbindungen) stabilisiert Vinculin den aufgespannten Zustand dieser Proteine, selbst wenn die eigentlich hierfür notwendige Spannung nachlässt, sodass zahlreiche Proteinbindestellen zugänglich bleiben [55]. Gleichzeitig führt Vinculin in beiden Strukturen durch die Rekrutierung von aktinbindenden Proteinen zu einer lokalen Umstrukturierung des Aktinnetzwerkes [56] [57] [48].

Neben Vinculin ist α -Catenin ein essentieller, intrazellulärer Bestandteil von Adhärenzverbindungen und wird ebenfalls als mechanosensitives Protein beschrieben [58]. Aufgrund von Strukturhomologien mit dem Protein Vinculin, erfolgte eine einheitliche Benennung der Domänen dieser beiden Proteine. Da das Protein Vinculin fünf, α -Catenin jedoch nur vier Domänen besitzt, fehlt die Domäne D2 im Letzteren [59]. In der ersten Domäne (D1a, D1b) des α -Catenins, am N-Terminus, sind Bindestellen für β -Catenin lokalisiert, in der zweiten Domäne (D3a, D3b) Interaktionsdomänen für Vinculin und α -Actinin [60] [59]. Die dritte Domäne (D4) weist ein Bindemodul für Afadin auf, während in der vierten, C-terminalen Domäne (D5) Bindedomänen für F-Aktin und ZO-1 lokalisiert sind (siehe Abbildung 11)[61] [62] [63].

Seine Mechanosensitivität erlangt α -Catenin durch die intramolekulare Interaktion der zweiten und dritten Domäne (D3a und D4), welche unter Spannung aufgelöst wird und

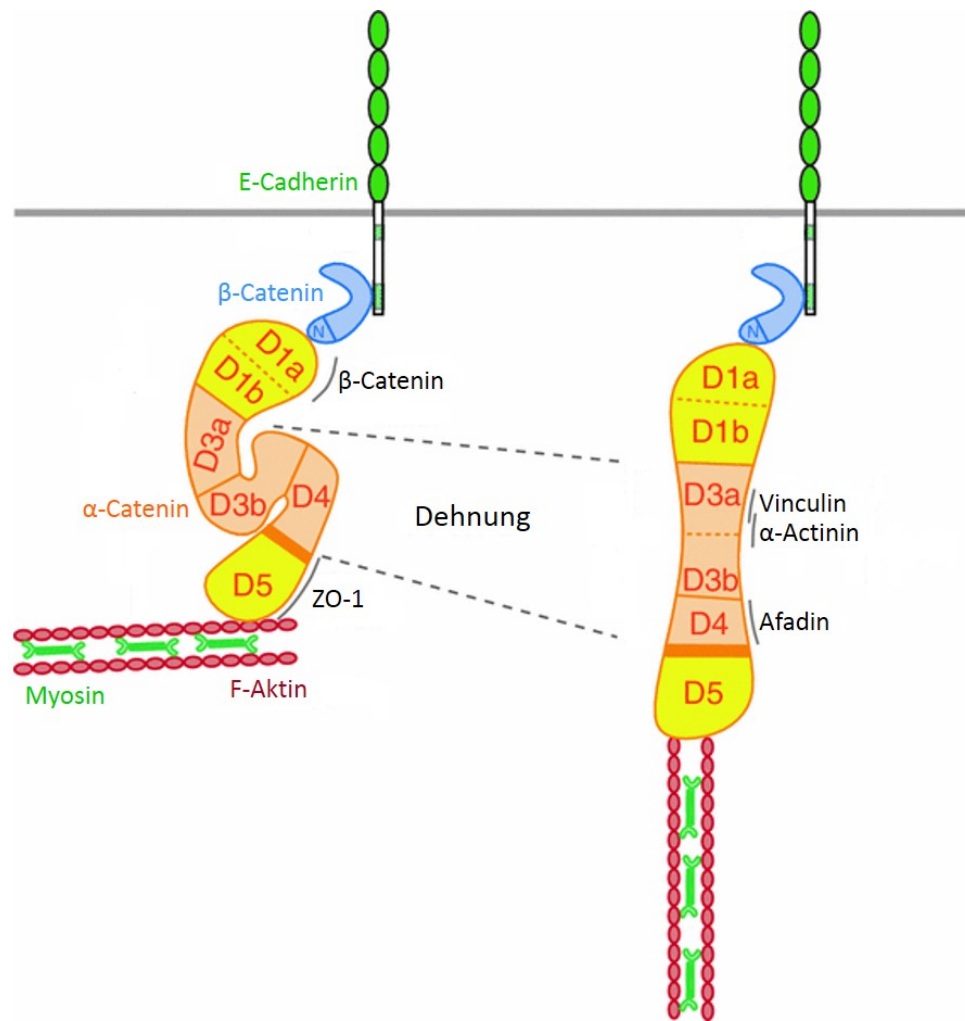


Abbildung 11: Schematische Darstellung von α -Catenin. Das α -Catenin bindet über seine D1-Domäne an β -Catenin und über seine D5-Domäne an F-Aktin. Die intramolekulare Verbindung der D4- und D3-Domäne wird unter Spannung aufgelöst, wodurch Bindestellen für Vinculin, Afadin und α -Actinin freigegeben werden. Verändert nach [40].

dadurch Bindestellen für Vinculin und andere Proteine freigibt [40] [64]. Die dehnungsabhängige Konformationsänderung von α -Catenin erlaubt eine Interaktion mit Vinculin, wodurch die Verbindung zwischen Adhärenzverbindung und Aktinnetzwerk verstärkt wird [64].

Zudem bietet α -Catenin mit seinen zahlreichen Bindestellen eine spannungsabhängige Plattform für die Assemblierung von F-Aktin organisierenden Proteinen wie Formin-1, α -Actinin oder dem Vasodilatator-stimulierten Phosphoprotein (VASP) [40]. Das Protein α -Catenin ist hierbei in der Lage, Kräfte zwischen dem Zytoskelett und

den Adhärenzverbindungen zu übertragen, wobei der genaue Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist [64] [65].

Die Ausbildung von kalziumabhängigen Adhärenzverbindungen beginnt mit der Dimerisierung von Cadherinen zweier benachbarter Zellen am extrazellulären N-Terminus. Die hierbei entstehenden Dimere sind homophil, nur in wenigen Ausnahmefällen ist die Ausbildung von heterophilen Dimeren bekannt [66]. Am intrazellulären C-Terminus der Cadherine lagern sich Ankerproteine wie α -, β -Catenin oder Vinculin an, welche die Cadherine mit dem Aktinnetzwerk der Zelle verbinden (siehe Abbildung 12). Hierbei werden durch die Ausbildung von Zell-Zell-Adhäsionskomplexen F-Aktin-regulierende Signalwege und Aktin-Regulatoren wie Arp2/3, N-WASP oder Formin-1 aktiviert, wodurch es zu einer Umstrukturierung des Aktinnetzwerkes kommt [40].

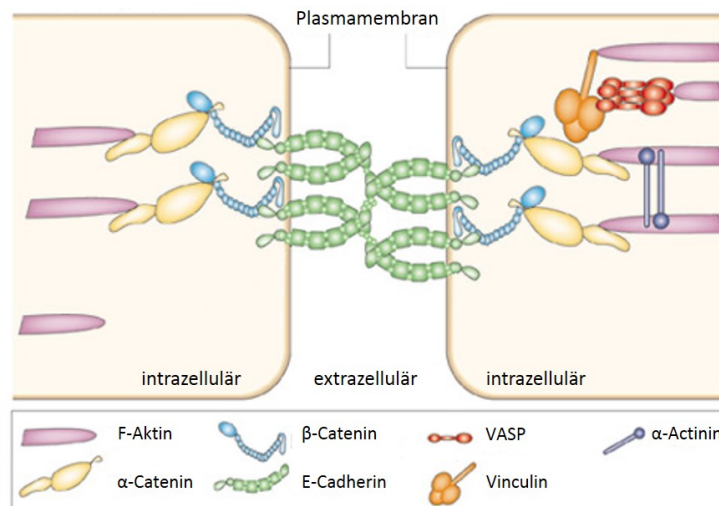


Abbildung 12: Schematischer Aufbau der Adhärenz Junction. Die transmembranen Cadherine sind über ihre extrazelluläre Domäne mit Cadherinen benachbarter Zellen verbunden. Intrazellulär sind sie an α - und β -Catenine gebunden und über Letztere an das zytoskelettale Aktinnetzwerk gekoppelt. Verändert nach [45].

Twiss und Rooij beschreiben die Ausbildung und Reifung der Adhärenzverbindungen wie folgt: Ausgelöst durch den Kontakt von Cadherinen benachbarter Zellen kommt es zur Ausbildung von sogenannten fokalen Adhärenzverbindungen (focal adherens junction FAJ). Hierbei handelt es sich um punktförmige Strukturen, welche eine hohe Ähnlichkeit zu Fokaladhäsionen aufweisen, wie diese an radiale F-Aktinbündel gekoppelt sind und das Adhäsionsprotein Vinculin beinhalten. Während der Reifung der FAJ zu linearen Adhärenzverbindungen (LAJ) kommt es zu einer Umstrukturierung des Aktinnetzwerkes.

Die basolateralen LAJ binden hierbei parallel orientierte Aktinbündel, wodurch sie im Vergleich zu FAJ weniger stark unter Spannung stehen. Das mechanosensitive α -Catenin liegt deshalb in ungedehnter Konformation vor, wodurch das Adhäsionsprotein Vinculin nicht länger gebunden werden kann. Durch die Polarisierung der epithelialen Zellen reifen die LAJs zu Zonula-Adhärenzverbindungen (ZAJ), welche mit dem apikalen Aktgürtel der Zellen verbunden sind. Dadurch liegt α -Catenin in diesen Verbindungen in aufgespannter Form vor und Vinculin kann wieder an den Komplex binden (siehe Abbildung 13) [40]. Die Kopplung an das Actomyosin-Netzwerk ist für die Stabilisierung der Adhärenzverbindung von großer Bedeutung, da so Spannungen am Zell-Zell-Kontakt auf das Zytoskelett übertragen werden können und der Zell-Zell-Kontakt dadurch selbst weniger Stress erfährt und so weniger stark belastet wird [67].

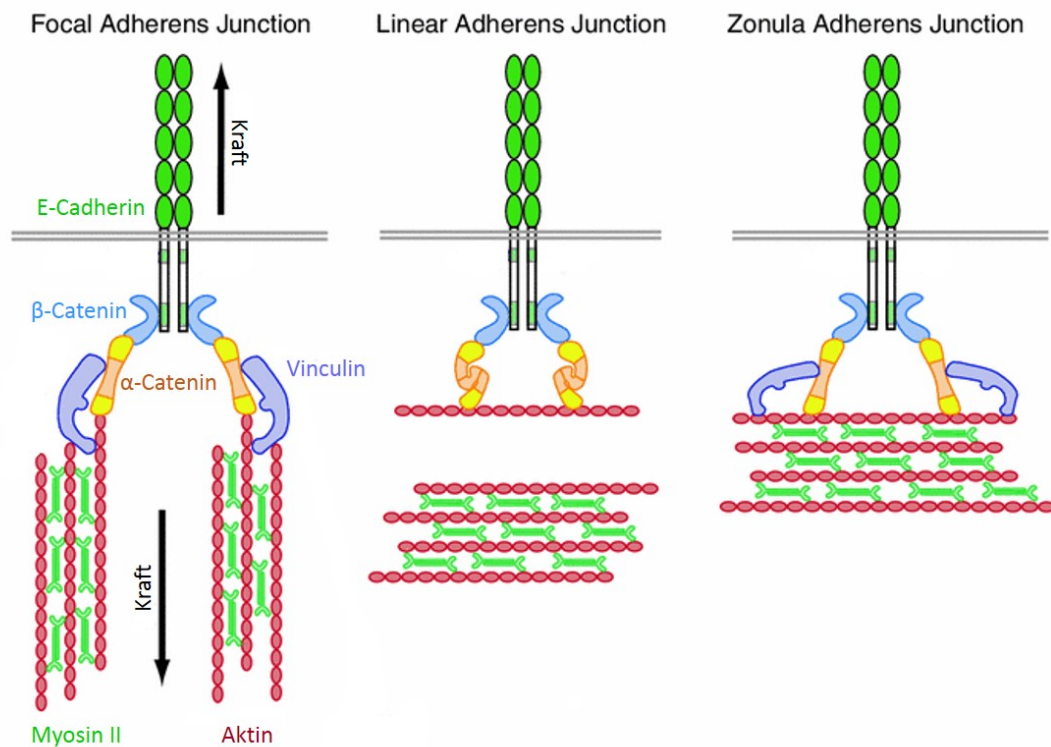


Abbildung 13: Reifung von Adherens Junctions. Die schematische Darstellung zeigt die Entwicklung von fokalen Adherens Junctions zu basolateralen linearen Adhärenzverbindungen, welche nach Polarisierung der Zellen mit dem apikalen Aktgürtel verbunden sind und Zonula Adherens Junctions bilden. Mit der Reifung der Adhärenzverbindungen geht eine Umstrukturierung des Aktinnetzwerkes einher. Das Protein Vinculin kann nur an aufgespanntes α -Catenin in fokalen Adherens Junctions und Zonula Adherens Junctions binden, in linearen Adherens Junctions ist α -Catenin entlastet und daher fehlt Vinculin dort. Verändert nach [40].

1.3.2 Struktur und Funktion von Zell-Matrix-Adhäsionen

Neben den zellulären Adhärenzverbindungen spielen die Zell-Matrix-Adhäsionen eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Haut und sind besonders bei der Zellmigration von großer Bedeutung. Zell-Matrix-Adhäsionen verbinden Zellen mit ihrer umgebenden extrazellulären Matrix und weisen, wie bereits für Zell-Zell-Adhäsionen beschrieben, einen dreigeteilten Aufbau auf.

Essentieller Bestandteil der Zell-Matrix-Adhäsionen sind die transmembranen Integrine. Ihre extrazelluläre Domäne bindet sequenzspezifisch an Liganden in der extrazellulären Matrix, ihre intrazelluläre Domäne ist über Ankerproteine indirekt an das Zytoskelett der Zelle gekoppelt. Aufgebaut sind Integrine jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit, welche zu nichtkovalenten Dimeren zusammengelagert sind. Diese können abhängig von der Interaktion mit Bindungspartner in einer gebogenen oder einer aufrechten Konformation vorliegen. Die aufrechte Konformation wird hierbei durch die Bindung an Talin verstärkt, wodurch die zytoplasmatischen Enden der α - und β -Integrinuntereinheiten getrennt werden und für die Bindung mit weiteren Proteinen zur Verfügung stehen [68]. Bislang sind mindestens 24 verschiedene Integrinkomplexe bekannt, welche aus den 18 Isoformen der α - und den 8 Isoformen der β -Untereinheit aufgebaut werden können (Hynes 2002). Intrazellulär verbinden Adapterproteine die Integrine mit dem Zytoskelett. Man unterscheidet zwischen den aktinegekoppelten Fokaladhäsionen und den keratingekoppelten Hemidesmosomen. Bei Hemidesmosomen handelt es sich um Multi-Protein-Komplexe, welche das intrazelluläre Keratinnetzwerk mit dem Glykoprotein Laminin in der extrazellulären Matrix verbinden. Zentraler Bestandteil dieser Strukturen sind die transmembranen Integrine $\alpha_6\beta_4$, deren extrazelluläre Domäne Laminin bindet, während ihre intrazelluläre Domäne über die Proteine Plectin und BPAG1e mit dem Keratinnetzwerk assoziiert.

Bei Fokaladhäsionen handelt es sich um 2-5 μm lange und 250-500 nm breite Multi-Protein-Komplexe, welche aus mindesten 192 verschiedenen Proteinen aufgebaut sind [69]. Hauptbestandteil sind auch hier transmembrane Integrine, welche über verschiedene Adapterproteine das intrazelluläre Aktinnetzwerk mit der extrazellulären Matrix verbinden. Mit Hilfe von hochauflösender Mikroskopie konnte ein tieferer Einblick in die Struktur von Fokaladhäsionen gewonnen werden, welcher einen dreischichtigen Aufbau beschreibt. Die erste Schicht ist die proximale Integrinschicht, welche als Signalüberträger fungiert.

Hieran beteiligt sind die zytoplasmatische Domäne des Integrins sowie die Signalproteine Paxillin und die fokale Adhäsionskinase (FAK). Die zweite Lage bildet die krafttransduzierende Schicht, in welcher unter anderem Vinculin und Talin lokalisiert sind und die Kraft zwischen Integrinen und dem Aktinnetzwerk übertragen. Die dritte Lage bildet die aktinregulierende Schicht, in welcher, neben zahlreicher anderer Proteine, auch die aktinassoziierten Proteine VASP, Zyxin und α -Actinin lokalisiert sind (siehe Abbildung 14) [70] [71] [48].

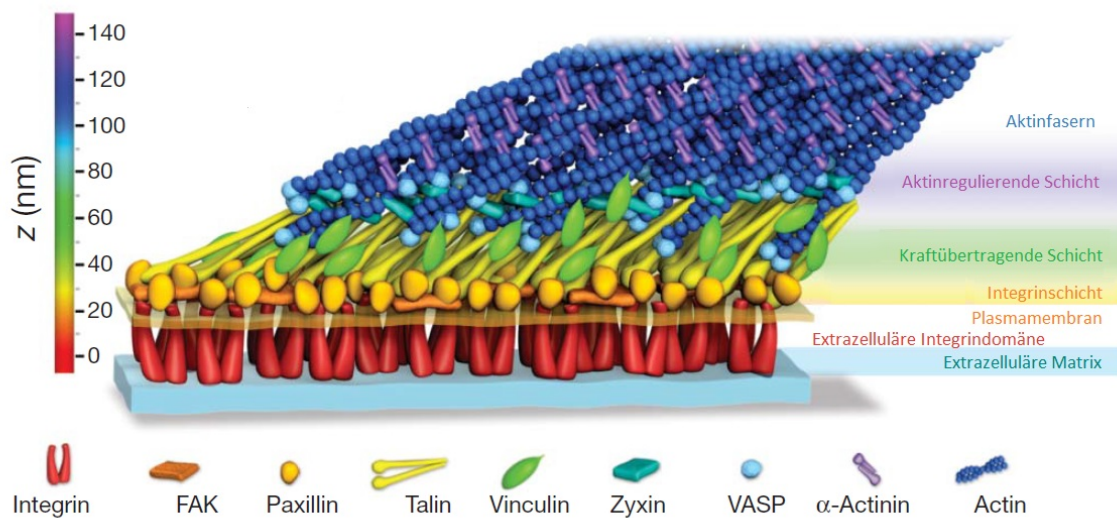


Abbildung 14: Aufbau einer Fokaladhäsion. Die transmembranen Integrine sind extrazellulär mit Proteinen der extrazellulären Matrix assoziiert. Intrazellulär sind sie an Paxillin und Vinculin gebunden, wobei letzteres zusammen mit Talin die kraftübertragende Schicht bildet. Diese Proteine sind direkt mit Aktinfasern oder mit aktinassoziierten Proteinen der aktinregulierenden Schicht verbunden. Verändert nach [70].

Obwohl sich die genaue Proteinzusammensetzung zwischen Fokaladhäsionen und Adhärenz Junctions unterscheidet, sind ihr dreischichtiger Aufbau sowie die Funktionen der einzelnen Schichten vergleichbar. Auch die Mechanotransduktion der Proteine in beiden kraftübertragenden Schichten und die dehnungsabhängige Vinculinrekrutierung sind ähnlich. Während in Fokaladhäsionen die Dehnung von Talin zur Rekrutierung und Anlagerung von Vinculin führt, ist es in Adhärenzverbindungen die Dehnung von α -Catenin, welche dadurch die Vinculinaffinität erhöht [48].

Seine zahlreichen Bindestellen und seine Lokalisation in Fokaladhäsionen prädestinieren

Vinculin für die Signalweiterleitung zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett. Die vinculinabhängige Verknüpfung von Zytoskelett und Substrat ermöglicht hierbei die bidirektionale Signalübertragung zwischen Zellen und ihrer Umgebung, bei welcher die Zelle externe Reize wahrnehmen und gleichzeitig durch die actomyosinvermittelte Übertragung von zellulären Kontraktionen Kräfte auf das Substrat ausüben kann [72] [73]. Die molekulare Zusammensetzung der Adhäsionen variiert zwischen den verschiedenen Arten, wie jungen Fokalkomplexen und gereiften Fokaladhäsionen, und ist stark von der Spannung abhängig, welche auf die Adhäsion wirkt [74] [73]. Hierbei ist es egal, ob eine endogene, aktinvermittelte oder exogene Kräfte wirken. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung des mechanosensitiven Vinculins an Fokaladhäsionen mit der Kraft, welche über das umliegende Substrat auf die Fokaladhäsionen ausgeübt wird, korreliert [73]. Auch vinculinfreie Zellen sind in der Lage Fokaladhäsionen auszubilden und adhäsive Kräfte zu generieren. Die Migration dieser Zellen weist eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit und eine geringere Persistenzlänge auf [75] [76] [77] [78]. Obgleich Vinculin für die Ausbildung von Adhäsionsstrukturen nicht essentiell ist, erhöht seine Anwesenheit die Stabilität dieser Strukturen sowie ihre Aktinassoziation [53] und ist für die Mechanosensorik dieser Verbindungen von großer Bedeutung.

1.4 Mechanosensorik und Signaltransduktion in Zellen

Wie die meisten Organe ist auch die Haut in lebenden Organismen permanenten mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt. Die zelluläre Reaktion auf diese Reize setzt eine Mechanosensitivität der Zellen voraus und kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. Diese reichen von Konformationsänderungen dehnungsabhängiger Ionenkanäle über eine Reorientierung des Zytoskeletts bis hin zu Veränderungen der Genexpression. Um widerstandsfähig und intakt zu bleiben, müssen die Zellen in der Lage sein mechanische Belastungen zu verarbeiten. Das Keratinnetzwerk - insbesondere das Keratinpaar K5/K14 - sind hierbei von großer Bedeutung.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Keratinnetzwerk eine ausgesprochen hohe Widerstandsfähigkeit besitzt und selbst Dehnung von über 100% unbeschadet übersteht [79] [80]. Hierbei versteifen sich Keratinfilamente als Reaktion auf Dehnung, ohne zu brechen und sind in der Lage sich nach einer Deformation schnell wieder zu erholen [81].

Eine anhaltende, zyklische Dehnung der Zellen führt zu einer Bündelung und Verdickung der Keratinfilamente [82]. Die Belastung scheint hierbei in peripheren Bereichen deutlich höher als um den Nukleus zu sein, weshalb eine intakte Verankerung zu desmosomalen Strukturen entscheidend für die Widerstandskraft des Keratinnetzwerkes zu sein scheint [83] [82]. Desmosomen erscheinen nach zwei Stunden zyklischer Dehnung elongiert, was auf eine gewisse Elastizität dieser Strukturen schließen lässt [82].

Von welcher Bedeutung das Keratinpaar K5/K14 für die Integrität des Netzwerkes ist, zeigt die Dehnung von Zellen, welche eine Mutation im Keratin 14 tragen. Die EBS-auslösende Mutation führt *in vitro* zu einem fragilen Keratinnetzwerk, welches mechanischer Beanspruchung nicht standhält. In diesen Zellen führt mechanischer Stress zu einer Fragmentierung des Keratinnetzwerkes und einer veränderten Desmosomen- und Hemidesmosomen-Lokalisation. Die Bildung von Keratinaggregaten scheint ihren Ursprung an der Verbindung des Netzwerkes zum Substrat, den Hemidesmosomen, zu haben, doch auch die desmosomalen Strukturen können in diesen Zellen mechanischen Belastungen nicht standhalten. Als schwächste Verbindung wurde die Verbindung zwischen dem transmembranen Desmoglein und dem zytoplasmatischen Desmoplakin identifiziert [82].

Neben Keratin ist Aktin ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts, welcher für die Stabilität und Formgebung der Zellen verantwortlich ist. Im Gegensatz zum Keratinnetzwerk, welches auch bei großen Dehnungsamplituden nur eine geringe Veränderung aufweist, zeigt das Aktinnetzwerk eine deutliche Reaktion auf zyklische Dehnungen, welche in einer erhöhten Anzahl an Stressfasern und einer verstärkten Kopplung an die entsprechenden Adhäsionsstrukturen resultiert [84]. Eine zyklische Dehnung von Zellen führt neben einer veränderten Zellform auch zu einer Orientierung des Aktinzytoskeletts senkrecht zur Zugrichtung [85] [86]. Grund hierfür scheint die Minimierung der Längenänderung der Aktinfasern zu sein, um die mechanischen Belastungen zu reduzieren [87] [88]. Die Stärke der Reorientierung ist hierbei von Parametern wie Frequenz, Amplitude und Dauer der Deformation abhängig [85] [86].

Der genaue Mechanismus, welcher von einer Deformation des Substrates zu einer Reorientierung des Aktinzytoskeletts führt, ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Drei unterschiedliche Mechanismen sind möglicherweise an der Wahrnehmung von Deformationen, der Signalweiterleitung und der anschließenden Reorientierung des Zytoskeletts

beteiligt. Hierzu zählen aktinegekoppelte Kalziumkanäle, welche unter Spannung zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle führen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Kanäle bei der Reorientierung nur eine untergeordnete Rolle spielen und diese auch in Abwesenheit von Kalzium stattfinden kann [89] [90].

Desweiteren scheinen fokale Adapterproteine wie p130Cas und Vinculin als Mechanosensoren zu fungieren [91]. Als Mechanismus der Mechanosensorik dieser Proteine wird eine dehnungsinduzierte Konformationsänderung unter Freigabe von Interaktionsdomänen bzw. Phosphorylierungsstellen beschrieben [74] [92] [91]. Für p130Cas konnte bereits gezeigt werden, dass eine Deletion dieses Proteins zu einer deutlich verminderten Reorientierung des Zytoskeletts führt [93]. Zusätzlich fungieren Aktinfasern selbst als Spannungssensor. Für verschiedene Proteine konnte eine spannungsabhängige Affinitätsänderung für die Bindung an Aktinfasern nachgewiesen werden. Myosin II beispielsweise bindet vermehrt an unter Spannung stehenden Aktinfasern, während das filamentabbauende Protein Cofilin eine höhere Affinität für entspannte Fasern aufweist [94] [95].

1.5 Zielsetzung

Krankheiten wie Epidermolysis bullosa simplex (EBS) führen zu schweren Hautschädigungen und sind auf Veränderungen des Proteins Keratin zurückzuführen. Während die Haut bei gesunden Menschen sehr widerstandsfähig und belastbar ist, haben bereits geringe Belastungen bei EBS-Patienten oft schwerwiegende Folgen und führen zur Blasenbildung oder zum Ablösen der Haut. Diese extremen Auswirkungen sind auf veränderte mechanische Eigenschaften der Zellen zurückzuführen, ausgelöst durch Mutationen in Keratinen [96] [97].

Eine Analyse der veränderten mechanischen Eigenschaften von Keratinozyten mit verschiedenen genetischen Hintergründen ist für die Erforschung und das Verständnis zahlreicher Hautkrankheiten essentiell. Aus diesem Grund beschäftigt sich diese Arbeit mit zytoplasmatischen Keratinen als zentrale Einheit biomechanischer Funktionen sowie Eigenschaften epithelialer Zellen und geht der Frage nach, welchen Einfluss Veränderungen des Keratinnetzwerkes auf die mechanischen Eigenschaften der Zellen haben. In vergleichenden Experimenten werden die Eigenschaften von nicht mutierten Kontrollzellen und

mutierten Keratinozyten mittels Rasterkraftmikroskopie näher charakterisiert.

Diese vergleichenden Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften *in vitro* waren bislang kaum möglich, da es, im Vergleich zu anderen Zytoskelettbestandteilen, wie Aktin oder Mikrotubuli, für die Deletion von Keratinen keine geeigneten Substanzen gibt. Zudem wirkt die große Anzahl an Keratinen (über 54 funktionelle Keratingene [98]) kompensatorisch, sodass beim Ausfall eines Keratins seine Funktion durch ein anderes ersetzt werden kann. Erst 2013 gelang der Arbeitsgruppe Magin (Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig) durch die Deletion des gesamten Keratin-TypI-Genclusters erstmals die Generierung einer stabilen, keratinfreien Keratinozyten-Zelllinie. Die Einbringung einzelner Keratine in diese Zellen ermöglicht die Untersuchung der mechanischen Funktionen spezifischer Keratinpaare und schafft so die Grundlage für die Aufklärung und Heilung verschiedener Krankheiten.

Die epidermale Differenzierung ist ein essentieller, physiologischer Entwicklungsprozess der Haut, welcher mit der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und Veränderungen der mechanischen Eigenschaften von Zellen einhergeht. Die genauen Auswirkungen von kalziuminduzierten Adhärenzverbindungen auf die mechanischen Eigenschaften von Keratinozyten werden im zweiten Teil dieser Arbeit analysiert. Hierbei wird der Einfluss veränderter Adhäsionsstrukturen auf die Reorientierung des Aktinnetzwerkes nach zyklischer Dehnung, auf die mechanischen Eigenschaften epidermaler Zellen sowie auf den Aufbau einer intakten Zellschicht näher untersucht, um einen detaillierten Einblick in das komplexe Zusammenspiel des epithelialen Zytoskeletts zu erlangen.

Bislang erfolgte die Untersuchung mechanischer Zelleigenschaften vornehmlich an Einzelzellen, wodurch es häufig zu artifiziellen Ergebnissen kommt. Die Anpassung der Kalziumkonzentration im Zellkulturmedium ermöglicht eine Anpassung an physiologischen Bedingungen *in vivo* und führt auch *in vitro* zur Ausbildung von Zell-Zell-Adhäsionen, wie sie bei der epidermalen Differenzierung gebildet werden. Dies ermöglicht in der vorliegenden Arbeit, Untersuchungen sowohl an Einzelzellen, als auch an konfluenten Zellschichten und gibt Aufschluss über die Bedeutung von kalziumabhängigen Adhärenzverbindungen für die mechanischen Eigenschaften von Zellen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialliste

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Hersteller
Analog Vortex Mixer	VWR, Radnor, USA
Exsikkator	DURAN Group GmbH, Wertheim
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Heizblock	Stuart Equipment, Staffordshire, UK
Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop (LSM 710)	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Axio Observer Z1	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
pH-Meter	Knick, Berlin
Rasterkraftmikroskop (NanoWizzar II)	JPK, Berlin
Lackschleuder (englisch: <i>spin coater</i>)	Süss-MicroTec, Garching

2.1.2 Software

Tabelle 2: Software

Programmname	Anwendung	Firma
Axiovision (Version 4.6.3)	Mikroskopsteuerung, Bildverarbeitung	Carl Zeiss, Jena
ImageJ (Version 1.51)	Bildverarbeitung	National Institute of Health, Maryland, USA
JPK Data Processing (Version 4.2.61)	Auswertung Rasterkraftspektroskopiedaten	JPK Instruments, Berlin
MATLAB (Version 9.0)	Bildverarbeitung	MathWorks, Massachusetts, USA
Zen (Version 8.0.0.273)	Mikroskopsteuerung, Bildverarbeitung	Carl Zeiss, Jena

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
Cantilever (Arrow-TL1AU)	Nano World, Neuchâtel, Neuenburg, Schweiz
Deckgläser (div. Größen)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einfrierbox (Mr. Frosty)	Nalgene Nunc, Rochester, USA
Glasbodenschalen	IBIDI, Martinsried
Handschuhe Pure G3	Kimberly-Clark Professional, Koblenz

...Fortsetzung der Tabelle

Verbrauchsmaterial	Firma
Immersionsöl (Immersol 518F)	Carl Zeiss, Jena
Kimtech Science Präzisionstücher	Kimberly-Clark Professional, Koblenz
Kryoröhrchen	VWR, Radnor, USA
Linsenreinigungstuch	Whatman, Maidstone, UK
Mini-PROTEAN TGX Fertiggele	BIO-RAD, Hercules, USA
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Parafilm	Bemis, Oshkosh, USA
Petrischalen	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen 10 µl; 200 µl; 1250 µl	Starlab, Hamburg
Plastikrührspatel	VWR, Radnor, USA
Reaktionsgefäß 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß 15 ml; 50 ml	Greiner Bio-one, Frickhausen
Silizium Mikrosphären (Radius: 5 µm)	Kisker Biotech, Steinfurt
Stripetten 5 ml; 10 ml; 50 ml	VWR, Radnor, USA
Wägeschiffchen (div. Größen)	VWR, Radnor, USA
Zellkulturschale mit Loch (18 mm)	Cell E&G LLC, San Diego, USA
Zellkulturflaschen 25 cm ² ; 75 cm ²	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Zellkulturschalen (Ø 3,5 cm)	VWR, Radnor, USA
Zellschaber	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalie	Firma
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, St. Louis, USA
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma, St. Louis, USA
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Chelex 100	Sigma, St. Louis, USA
Collagen Typ 1	LifeTechnologies, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Sigma, St. Louis, USA
DMEM ohne Phenolrot mit GlutaMAX	Life Technologies, Carlsbad, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis, USA
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt (97%)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, St. Louis, USA
Ethylenglykol-bis(aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma, St. Louis, USA
Fibronektin	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Fluoromount	Sigma, St. Louis, USA
FluoSpheres Crimson Beads	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS) Gold	PAA Laboratories, Cölbe
Glucose	Merck, Darmstadt

...Fortsetzung der Tabelle

Chemikalie	Firma
Glycin	Sigma, St. Louis, USA
Ham's F12 Zellkulturmedium	Biochrom, Berlin
Ham's F12 Zellkulturmedium	Merck, Darmstadt
Laemmli Ladepuffer	BIO-RAD, Hercules, USA
Isopropanol Picograde	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, St. Louis, USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma, St. Louis, USA
Mangan(II)-chlorid (MnCl_2)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, St. Louis, USA
Paraformaldehyd (PFA) (37%)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (10.000 Units/ml)	Sigma, St. Louis, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma, St. Louis, USA
Phosphataseinhibitor Cocktail 1&2	Sigma, St. Louis, USA
Proteaseinhibitor Cocktail	Sigma, St. Louis, USA
RIPA-Puffer	Sigma, St. Louis, USA
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden
Sylgard 184	Dow Corning, Midland, USA
Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane	Sigma, St. Louis, USA

...Fortsetzung der Tabelle

Chemikalie	Firma
Triton-X-100	Sigma, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA	Sigma, St. Louis, USA
Tween-20	Sigma, St. Louis, USA
UHU plus endfest 300	UHU, Bühl

2.1.5 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Tabelle 5: Zytoskelettpuffer (englisch: *cytoskeleton buffer* (CB)) pH 6,1

Chemikalie	Menge
EGTA	1,902 g/l
Glukose	0,9 g/l
MES	1,95 g/l
MgCl ₂	0,476 g/l
NaCl	8,77 g/l
Streptomycin	1 g/l

Tabelle 6: Glycin-CB 30 mM

Chemikalie	Menge
Glycin	0,1126 g
CB	ad. 50 ml

Tabelle 7: Fixierlösung

Chemikalie	Menge
Paraformaldehyd (37%)	5 ml
CB	45 ml

Tabelle 8: Blockierlösung

Chemikalie	Menge
Magermilchpulver	2,5 g
CB	ad. 50 ml

Tabelle 9: Permeabilisierungslösung

Chemikalie	Menge
Triton-X-100	0,25 ml
CB	49,75 ml

Tabelle 10: Lysepuffer für Proteinisolation

Chemikalie	Menge
RIPA-Puffer	970 µl
Proteaseinhibitor	10 µl
Phosphataseinhibitor	20 µl

Tabelle 11: Lysepuffer für RNA-Isolation

Chemikalie	Menge
RLT-Puffer	990 µl
β -Mercaptoethanol	10 µl

2.1.5.1 Zusammensetzung des Zellkulturmediums für Zellen mit mutierten Keratinnetzwerken und die entsprechenden Kontrollzellen

Für die Kultivierung von murinen KTyIWT-, KTyI/-, KTyI/-K14- und KTyI/-K14R131P-Zellen wurden 450 ml FAD+ (DMEM/Ham's F12) Medium (Merck, Darmstadt) mit 50 ml kalziumfreien fötalem Kälberserum (PAA, Cölbe) versetzt. Um die Kalziumionen aus dem Serum zu entfernen wurde das Serum zuvor mit 8 g/50 ml Chelex 100 über Nacht auf einem Drehrad vorinkubiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt, bevor das Serum sterilfiltriert und dem Medium zugefügt oder bei 4 °C gelagert wurde.

Tabelle 12: Zusätze für 500 ml Zellkulturmedium FAD+ (DMEM/Ham's F12)

Zusatz	Hersteller	Stockkonzentration	Finalkonzentration
Adenin	Sigma	45 mM	0,18 mM

...Fortsetzung der Tabelle

Zusatz	Hersteller	Stockkonzentration	Finalkonzentration
Hydrokortison	Sigma	1 mg/ml	0,5 µg/ml
Insulin	Sigma	5 mg/ml	5 µg/ml
EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor)	Invitrogen	10 mg/ml	10 ng/ml
Choleratoxin	Sigma	0,01 mM	10 ⁻⁷ mM
Glutamin	Invitrogen	200 mM	2 mM
Penicillin	Invitrogen	10.000 U/ml	100 U/ml
Streptomycin	Invitrogen	10 mg	100 µg

2.1.5.2 Zusammensetzung des Zellkulturmediums für Zellen mit mutierten Adhäsionsstrukturen und die entsprechenden Kontrollzellen

Für die Kultivierung von VincCtrl-, VincKO-, ECadCtrl-, ECadKO-, ECadKOPCadKD- sowie α CatKD-Zellen wurden 450 ml FAD+ (DMEM/Ham's F12) Medium (Biochrom, Berlin) mit 50 ml kalziumfreien fötalem Kälberserum (PAA, Cölbe) versetzt. Das Serum wurde hierfür wie zuvor beschrieben mit Chelex 100 behandelt, um sämtliche Kalziumionen zu entfernen.

Tabelle 13: Zusätze für 500 ml Zellkulturmedium FAD+ (DMEM/Ham's F12)

Zusatz	Hersteller	Menge	Finalkonzentration
Vitamin C	Sigma	0,025 g	0,2 mM
Adenin	Sigma	750 µl	0,18 mM
Hydrokortison	Sigma	50 µl	0,5 µg/ml

...Fortsetzung der Tabelle

Zusatz	Hersteller	Menge	Finalkonzentration
Insulin	Sigma	500 µl	5 µg/ml
EGF	Sigma	500 µl	10 ng/ml
Choleratoxin	Sigma	5 µl	1 nM
L-Glutamin	Biochrom	5 ml	2 mM
Penicillin	Biochrom	5 ml	100 U/ml
Streptomycin	Biochrom	5 ml	100 µg

Tabelle 14: Einfriermedium für Keratinozyten

Chemikalie	Menge
Kalziumfreies fötales Kälberserum	4,5 ml
DMSO	0,5 ml

2.1.5.3 Zusammensetzung des Zellkulturmediums für Zellen mit reduzierter Plectinexpression sowie die entsprechenden Kontrollzellen

Tabelle 15: Mediumzusammensetzung für die Kultivierung von A431-Zellen

Chemikalie	Menge
DMEM ohne Phenolrot mit GlutaMAX	450 ml
Fötales Kälberserum	50 ml

2.1.6 Antikörper und Farbstoffe

Tabelle 16: Primäre Antikörper

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Anti E-Cadherin aus Maus	610182	BD Bioscience, San José, USA
Anti Paxillin aus Maus	AHO0942	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti Vinculin aus Kaninchen	700062	Invitrogen, Carlsbad, USA
Anti Vinculin aus Maus	V9131	Sigma, St. Louis, USA

Tabelle 17: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Alexa Fluor 488 Anti Kaninchen aus Huhn	A21441	Life Technologies, Carlsbad, USA
Alexa Fluor 488 Anti Maus aus Huhn	A21200	Life Technologies, Carlsbad, USA
Alexa Fluor 633 Anti Kaninchen aus Ziege	A21071	Life Technologies, Carlsbad, USA
Alexa Fluor 633 Anti Maus aus Ziege	A21052	Life Technologies, Carlsbad, USA

Tabelle 18: Farbstoffe

Bezeichnung	Hersteller
Alexa Fluor 488-i-Phalloidin	Abnova, Taipei City, Taiwan
Alexa Fluor 546- Phalloidin	Life Technologies, Carlsbad, USA
Alexa Fluor 633-Phalloidin	Life Technologies, Carlsbad, USA

2.2 Generierung und Kultivierung der verwendeten Zellen

2.2.1 Zellen mit mutiertem Keratinnetzwerk sowie die entsprechenden Kontrollzellen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen handelt es sich um murine, epidermale Keratinozyten. Die Isolation der Kontroll-Keratinozyten (KTyIWT) sowie die Generierung der keratinfreien Keratinozyten (KTyI^{-/-}) und der Rescue-Zellen (KTyI^{-/-}K14 und KTyI^{-/-}K14R131P) erfolgte in der Arbeitsgruppe Magin (Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig). Mit Hilfe des Cre/loxP-Systems konnte diese Arbeitsgruppe erstmals eine keratinfreie Keratinozyten-Zelllinie etablieren.

Beim Cre/loxP-System handelt es sich um ein Rekombinations-System, welches die Deletion spezifischer DNA-Sequenzen in lebenden Organismen ermöglicht. Zentraler Bestandteil dieses Systems ist Cre (cyclization recombination), eine natürlich vorkommende Rekombinase des Bakteriophagen P1. Diese Rekombinase katalysiert die Spaltung und Rekombination zwischen zwei loxP (locus of X-over P1)-Erkennungssequenzen, wobei die zwischen den Erkennungssequenzen befindliche DNA-Sequenz als zirkuläres Produkt herausgeschnitten und in der Zelle abgebaut wird. Für die Generierung der keratinfreien Keratinozyten wurde hierbei der gesamte Keratin-Typ-I-Komplex deletiert, sodass nur noch basische Keratine exprimiert werden, welche aufgrund des fehlenden Bindungspartners jedoch keine Keratinfilamente mehr aufbauen können. Zur Herstellung der Rescue-Zellen wurde

in diese keratinfreien Keratinozyten mittels lentiviraler Vektoren cDNA eines spezifischen Keratins (Keratin 14) eingebracht [99]. Die Expression dieses Keratins schafft die Voraussetzung für die Ausbildung funktioneller Heterodimere und ermöglicht dadurch die Ausbildung eines Keratinnetzwerkes. Zusätzlich wurden Rescue-Zellen (KTyI-/-K14R131P) generiert, in welche cDNA des murinen Keratin 14 mit einer Mutation an der Position 131 eingebracht wurde. Bei dieser Mutation, welche sich im Helix-Initiierungsmotiv des Keratins 14 befindet, wurde die Aminosäure Arginin gegen die Aminosäure Prolin ausgetauscht, was intrazellulär zur Bildung von Keratinaggregaten führt. Eine entsprechende Mutation des humanen Keratins 14 (K14R125P) verursacht bei Menschen die Krankheit Epidermolysis bullosa simplex.

2.2.2 Zellen mit mutierten Adhäsionsstrukturen sowie die entsprechenden Kontrollzellen

Die Vinculin-Knockout-Zellen (VincKO), E-Cadherin-Knockout-Zellen (ECadKO), E-Cadherin-Knockout-P-Cadherin-Knockdown-Zellen (ECadKOPCadKD) sowie die zugehörigen Kontrollzellen (VincCtrl-, ECadCtrl-Zellen) wurden von der Arbeitsgruppe Niessen (Department of Dermatology and CECAD, Köln) zur Verfügung gestellt. Die Knockout-Zellen wurden ebenfalls mit Hilfe des Cre/loxP-Systems generiert (siehe [100] [101]). Die E-CadKOP-CadKD-Zellen wurden durch lentivirale Transduktion von E-CadKO-Zellen generiert. Die hierfür verwendete C14 shRNA ist gegen P-Cadherin gerichtet und führt zu einer Herunterregulierung (englisch: *knockdown*) der P-Cadherin-Expression [102]. Die Versuche an diesen Zellen wurden in Kooperation mit B. Nöthel durchgeführt.

Für die Isolierung der primären Keratinozyten wurde die Epidermis aus der Haut von neugeborenen Mäusen separiert, um anschließend die epidermalen Keratinozyten zu isolieren. Alle Zellen wurden bei 32 °C in feuchter Atmosphäre bei einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Dem FAD- Zellkulturmedium wurde 10% kalziumfreies fötales Kälberserum zugesetzt. Die niedrige Kulturtemperatur sowie das kalziumfreie Medium dienen dazu, eine spontane Differenzierung der Zellen zu verhindern.

2.2.3 Zellen mit reduzierter Plectinexpression sowie die entsprechende Kontrollzellen

Die A431 Zellen, in welchen das Protein Plectin herunterreguliert ist, wurden in der Arbeitsgruppe Leube (Institut für molekulare und zelluläre Anatomie (MOCA), der Uniklinik der RWTH Aachen) generiert. Bei diesen Zellen handelt es sich um Vulvakarzinom-Zellen, in welche mittels lentiviraler Vektoren shRNA eingebracht wurde. Die Zellen, in welchen Plectin herunterreguliert wurde, wurden mit shRNA gegen Plectin transduziert (shPlectin-Zellen), die Kontrollzellen mit funktionsloser, fragmentierter shRNA (shCtrl-Zellen). Eine detaillierte Beschreibung ist in Moch et al. 2016 zu finden [103].

2.2.4 Passagieren der Zellen

Das Passagieren der Zellen zur Kultivierung oder zur Aussaat für Zellexperimente erfolgte bei Erreichen einer 90%igen Konfluenz. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen mit einer Konfluenz von ca. 40% auf neue Zellkulturflaschen ausgesät. Für die Durchführung von Experimenten wurden sie in der gewünschten Zellzahl auf die entsprechenden Substrate gegeben. Hierfür wurden alle verwendeten Lösungen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen, die Zellen einmal mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA für 12 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Komplexierung zweiwertiger Ionen durch EDTA sowie die enzymatische Reaktion des Trypsins führen hierbei zum Ablösen der Zellen von der Oberfläche. Die anschließende Zugabe von serumhaltigem Medium stoppt die enzymatische Reaktion des Trypsins. Die in Suspension befindlichen Zellen wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für drei Minuten bei 180 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in frischem Medium gelöst und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden alle Zellkulturarbeiten an einer Sterilbank durchgeführt.

2.2.5 Kryokonservierung der Zellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung erfolgte die Kryokonservierung der Zellen. Hierfür wurden die Zellen von ihren Substraten abgelöst und in Keratinozyteneinfriermedium re-

suspendiert. Anschließend wurden jeweils 300.000 Zellen in 0,5 ml Einfriermedium in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox gestellt und über Nacht bei -80 °C gelagert, wodurch ein Temperaturabfall von 1 °C/min erreicht wurde. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.6 Einbringung von siRNA in Zellen mittels fusogener Liposomen

Für die detaillierte Untersuchung von zellulären Adhärenzverbindungen wurde das Protein α -Catenin in Kontroll-Keratinocyten (ECadCtrl-Zellen) herunterreguliert. Hierfür wurde siRNA gegen α -Catenin mittels Fusion in die Kontroll-Zellen eingebracht. Bei der Fusion handelt es sich um ein Verfahren, bei welchem fusogene Liposomen als Transportmittel für Farbstoffe, Proteine oder RNA dienen. Hierbei sind die Liposomen mit der entsprechenden Substanz beladen, welche sie durch Fusion mit der Zellmembran ins Zytoplasma freigeben.

Für die Fusion wurden 16.700 Zellen/cm² auf Zellkultursubstrate ausgesät. 18 Stunden nach Aussaat wurden die adhärenenten, aufgespannten Zellen von M. Hoffmann (ICS-7) fusioniert. Eine zweite Fusion erfolgte 24 Stunden später. Zur Überprüfung der Fusionseffizienz wurde eine Protein- bzw. RNA-Isolierung 24 Stunden nach der zweiten Fusion von M. Hoffmann (ICS-7) und B. Nöthel (ICS-7) durchgeführt. Anhand der isolierten RNA wurde mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion die Genexpression von α -Catenin analysiert. Da die Reduzierung der Genexpression von α -Catenin keine Auswirkungen auf bereits bestehendes α -Catenin hat, wurde zusätzlich die Menge an zellulärem α -Catenin bestimmt. Hierfür wurde mit Hilfe von Western Blots (durchgeführt von B. Nöthel, ICS-7) anhand der isolierten Proteine die Menge an α -Catenin 24 Stunden nach zweiter Fusion bestimmt. Für Dehnungsexperimente wurden die Zellen drei Stunden nach der zweiten Fusion vom Zellkultursubstrat abgelöst und mit einer Dichte von 21.200 Zellen/cm² für Experimente an Zellschichten bzw. 2.100 Zellen/cm² für Einzelzell-Analysen auf fibronectinbeschichtete Zugkammern ausgesät. Die Durchführung der Dehnungsexperimente erfolgte 24 Stunden nach der zweiten Fusion. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen adhärenent, aufgespannt und zeigten keine morphologischen Auffälligkeiten. Eine vergleichbare, nicht fusionierte Kontrolle wurde stets mitgeführt.

2.3 Substrate zur Kultivierung von Zellen

Grundvoraussetzung für die Kultivierung von Zellen *in vitro* ist eine erfolgreiche Substratadhäsion der Zellen. Hierbei spielt die Oberflächenbeschaffenheit der Zellkultursubstrate eine entscheidende Rolle. Für die Kultivierung aller in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden deshalb Zellkultursubstrate aus Polystyrol verwendet, welche durch physikalische Oberflächenbehandlung seitens des Herstellers eine optimale Zelladhäsion gewährleisten. Um bei mikroskopischen Aufnahmen eine geringere Schichtdicke und eine optimale Transparenz zu erreichen, wurden für Experimente mit anschließender immunzytochemischer Färbung Glas-Substrate verwendet. Diese wurden zur Anpassung an die *in vivo* Umgebung der Zellen und zur Verbesserung der Zelladhäsion vor Aussaat der Zellen mit dem extrazellulären Matrix-Protein Fibronektin beschichtet.

Die natürliche Umgebung der Zellen *in vivo* beeinflusst nicht nur ihr Adhäsionsverhalten, sondern ist auch für ihre mechanischen Eigenschaften verantwortlich. Für die Analyse mechanischer Eigenschaften von Zellen ist eine natürliche, nicht artifizielle Umgebung deshalb von hoher Bedeutung. Hierbei spielt neben der Proteinzusammensetzung auch die Elastizität des Zellsubstrates eine große Rolle. Um artifizielle Einflüsse von steifen Zellkultursubstraten zu reduzieren sowie die natürliche Dehnung von Zellen zu simulieren, wurden deshalb in dieser Arbeit auch elastische Silikonkautschuksubstrate verwendet. Neben seiner hohen Elastizität weist der verwendete Silikonkautschuk eine hohe Biokompatibilität auf und ist (in den hier verwendeten Mischungsverhältnissen) linear-elastisch deformierbar. Aufgrund seiner Transparenz eignet sich das farblose Polymer zudem für mikroskopische Analysen. Es ermöglicht außerdem die Abformung kleinster Strukturen, wodurch es vielseitig einsetzbar ist.

Für die Herstellung der elastischen Substrate wurde das Zweikomponentensystem Sylgard 184 (Dow Corning) verwendet. Die erste Komponente, das Basisöl, ist ein vinylterminiertes Dimethylsiloxan, welches durch katalytische Hydrolyse mit dem Kreuzvernetzer, einem methylhydrosiloxan-Dimethylsiloxan-Copolymer, reagiert. Das Mischungsverhältnis von Basisöl und Kreuzvernetzer bestimmt hierbei die Elastizität des Elastomers, wobei ein höherer Anteil an Kreuzvernetzer zu einem steiferen Substrat führt (siehe Tabelle 19). Zur Vermeidung von chargenabhängigen Schwankungen wurden die mechanischen Eigenschaften regelmäßig von Nico Hampe (ICS-7) charakterisiert [104].

Tabelle 19: Übersicht der Mischungsverhältnisse und Steifigkeiten von Polydimethylsiloxan

Masseanteil Basisöl	Masseanteil Kreuzvernetzer	Elastizität [kPa]
1	10	1000
1	40	50
1	50	15
1	55	5

Für die Herstellung elastischer Zellkultursubstrate wurden Basisöl und Kreuzvernetzer im gewünschten Verhältnis (siehe Tabelle 19) zusammengegeben und fünf Minuten manuell gründlich vermischt. Hierbei entstandene Lufteinschlüsse wurden anschließend durch Entgasen des Gemisches entfernt. Der entgaste, nicht kreuzvernetzte Silikonkautschuk wurde für die Herstellung von elastischen Substraten auf Glasdeckgläser aufgetragen oder zur Herstellung anderer elastischer Substrate, wie elastischer Zugkammern, weiter verarbeitet. Die Kreuzvernetzung des Silikonkautschuks erfolgte für 16 Stunden bei 60 °C.

2.4 Durchführung immunzytochemischer Färbungen

Mittels Immunfluoreszenzfärbung können spezifische zelluläre Proteine angefärbt werden, was eine vergleichende Analyse dieser Proteine unter verschiedenen Bedingungen ermöglicht. Der Einfluss der zyklischen Dehnung sowie Kalziums auf bestimmte Proteine kann so gezielt untersucht werden.

Vor der Färbung müssen die Zellen zunächst fixiert werden. Hierfür wurde das Zellkulturmedium abgenommen und 3,7% Paraformaldehyd (PFA) gelöst in Zytoskelett-Puffer (englisch: *cytoskeleton buffer* (CB)) für 15 Minuten bei 37 °C auf die Zellen gegeben. Die PFA-Lösung wurde abgenommen und gegen Glycin-CB ersetzt. Es folgte die Permeabilisierung der Zellmembran, welche das Eindringen von Farbstoffen und Antikörpern in die

Zelle ermöglicht. Hierzu erfolgte die Inkubation mit 0,5% Triton-X-100 in CB für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Permeabilisierungslösung abgenommen und Tritonrückstände durch dreimaliges Waschen mit CB von den Zellen entfernt. Für die Orientierungsanalysen des Aktinnetzwerkes nach Dehnung wurden die Zellen anschließend mit einer 1:400 Alexa Fluor-Phalloidin in CB –Lösung für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei indirekten Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte nach der Permeabilisierung zunächst ein Blockierungsschritt, bei welchem unspezifische Antikörperbindstellen durch 45 minütige Inkubation mit einer Blockierungslösung abgesättigt wurden. Es folgte die Inkubation des primären Antikörpers in einer 1:200 Verdünnung in einer 1%igen Milchkpulver-CB-Lösung für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde der nicht gebundene, primäre Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 1% MP in CB entfernt. Der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper wurde in einer 1:200 Verdünnung in 1% Milchkpulver in CB für 60 Minuten auf die Zellen gegeben. In dieser Zeit bindet der sekundäre Antikörper spezifisch den entsprechenden primären Antikörper, wodurch es zu einer indirekten Fluoreszenzmarkierung des Proteins kommt. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper abgenommen und Rückstände durch zweimaliges Waschen mit CB entfernt.

Um die Haltbarkeit der gefärbten Proben zu verlängern, wurden sie anschließend eingedeckelt. Hierfür wurden sie zunächst zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, um sämtliche Salz- und Proteinrückstände von den Proben zu entfernen. Anschließend wurden 20 µl Eindeckelmedium (Fluoromount) auf die Zellen gegeben und mit einem Deckglas (Durchmesser 12 mm, #1) bedeckt.

2.5 Mikroskope und Geräte

2.5.1 Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie

Der Einfluss externer Reize auf die Lokalisation bestimmter Proteine sowie die Aktinfaserorientierung wurde anhand von immunzytochemischen Färbungen näher untersucht. Die Fluoreszenzmikroskopie stellt eine spezielle Form der Lichtmikroskopie dar, bei welcher

Fluoreszenzfarbstoffe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Durch die Anregung gelangen die Elektronen der Fluoreszenzfarbstoffe für wenige Nanosekunden auf ein höheres Energieniveau, von welchem sie anschließend wieder auf ihr Ursprungsniveau zurückfallen. Beim Übergang der Elektronen zum Ursprungsniveau wird Energie zum Teil in Form von Photonen freigesetzt, welche im Mikroskop detektiert werden können. Da ein Teil dieser Energie in Form von Wärme abgegeben wird, besitzt das emittierte Licht eine höhere Wellenlänge verglichen mit der Anregungswellenlänge. Aufgrund der Überlagerung der schwachen Fluoreszenz mit dem intensiven Anregungslicht, bedarf es bei der Fluoreszenzmikroskopie spezieller Filtersysteme, um Anregungs- und Emissionslicht voneinander zu trennen.

2.5.2 Aufbau eines konfokalen Mikroskops

Für die Aufnahmen von immunzytochemisch gefärbten Proteinen wurde in dieser Arbeit ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 710)(Carl Zeiss, Jena) verwendet. Bei der konventionellen, nicht-konfokalen Mikroskopie wird die komplette Probe beleuchtet um Informationen aus einem großen Volumenbereich der Probe zu erhalten. Die konfokale Mikroskopie hingegen bietet den Vorteil, dass einzelne Ebenen der Probe getrennt voneinander analysiert werden können, wodurch eine gering erhöhte Auflösung in X- und Y-Richtung sowie eine deutliche Kontrasterhöhung erzielt werden kann. Grundvoraussetzung hierfür ist eine Lochblende, welche nur Licht aus einer bestimmten Objektebene durchlässt und das Licht aus anderen Ebenen ausblendet.

In Abbildung 15 ist der schematische Aufbau eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes dargestellt. Ein Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge wird über einen dichroitischen Spiegel in das Objektiv geleitet und in die Fokusebene der Probe fokussiert. Es kommt zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes in der Probe und zur Emission langwelligeren Fluoreszenzlichts. Dieses wird vom Objektiv gesammelt und gelangt durch den dichroitischen Spiegel – welcher das kurzwellige Anregungslicht blockiert- auf die Lochblende. Diese ist entscheidend dafür, wie viel Licht aus der Probe auf den Photomultiplier-Detektor gelangt.

Bei der für diese Arbeit durchgeführten Fluoreszenzmikroskopie wurde zur Anregung von

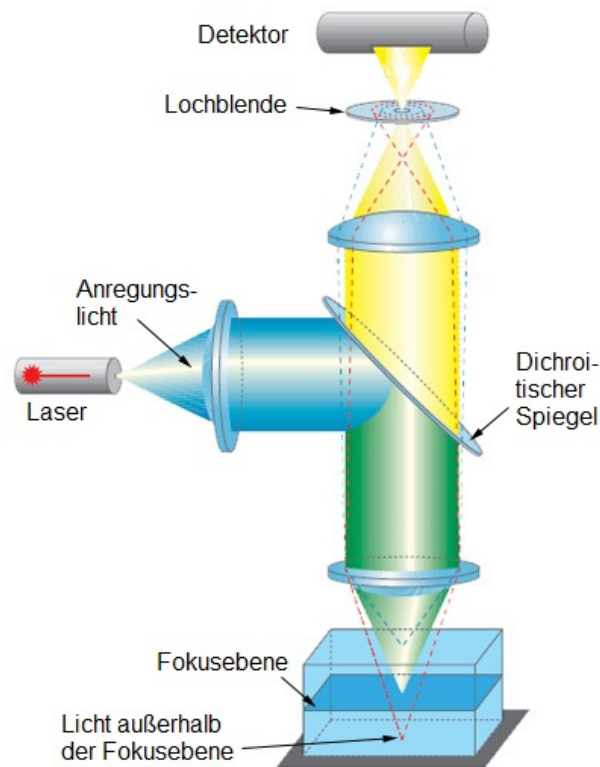


Abbildung 15: Schematischer Aufbau eines konfokalen Mikroskopes. Verändert nach [105].

Alexa Fluor 488 ein Argon-Ionen-Laser verwendet. Alexa Fluor 546 und 633 wurden mit Helium-Neon-Lasern der Wellenlängen 546 nm und 633 nm angeregt. Die emittierte Fluoreszenz der Farbstoffe wurde für Alexa Fluor 488 mit einem Bandpassfilter 493-557 nm detektiert, für Alexa Fluor 546 mit einem Bandpassfilter für die Wellenlängen 570-630 nm und für Alexa Fluor 633 mit einem Langpassfilter (640 nm). Zudem wurde der Hauptfarbteiler (488/543/633) sowie ein 40x EC-PlanNeofluoar Ph3 Ölobjektiv verwendet. Helligkeit und Kontrast der in dieser Arbeit abgebildeten Immunfluoreszenzaufnahmen wurden zur besseren Visualisierung nachträglich verstärkt.

2.5.3 Aufbau und Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops

Das 1986 von Binning, Quate und Gerber entwickelte Rasterkraftmikroskop bietet ein Verfahren zur Darstellung von Oberflächentopographien im Nanometerbereich. Ohne den Einsatz von Linsen oder Elektronen ist hierbei sogar teilweise eine atomare Auflösung

möglich. Darüber hinaus kann das Rasterkraftmikroskop auch zur Analyse von Materialeigenschaften, wie Elastizität oder chemischer Zusammensetzung verwendet werden, wodurch es in einem breiten interdisziplinären Anwendungsbereich Verwendung findet. Der Einsatz in Luft und Flüssigkeiten ermöglicht die Aufrechterhaltung von nativen, physiologischen Bedingungen für biologische Proben und macht das Rasterkraftmikroskop zu einer wichtigen Untersuchungsmethode innerhalb der Zellbiologie.

Das Herzstück des Rasterkraftmikroskopes bildet eine wenige hundert Mikrometer lange und 20-80 μm breite, aus Silizium oder Siliziumnitrid bestehende Blattfeder, welche auch als Cantilever bezeichnet wird. Zur besseren Handhabung ist der Cantilever an einem Ende an einem wenige Millimeter großen Metallstück befestigt. Das freie Ende des Cantilevers besitzt an der Unterseite eine feine Spitze, welche verschiedene Geometrien aufweisen kann und zum Abrastern der Probe verwendet wird. Die Auslenkung des Cantilevers wird optisch detektiert, indem ein Laserstrahl auf die Rückseite des Cantilevers positioniert und dessen Licht über einen Umlenkspiegel auf eine segmentierte Photodiode reflektiert wird. Die präzise Steuerung des Cantilevers erfolgt über ein Piezoelement, welches sich an seinem Ende befindet (siehe Abbildung 16).

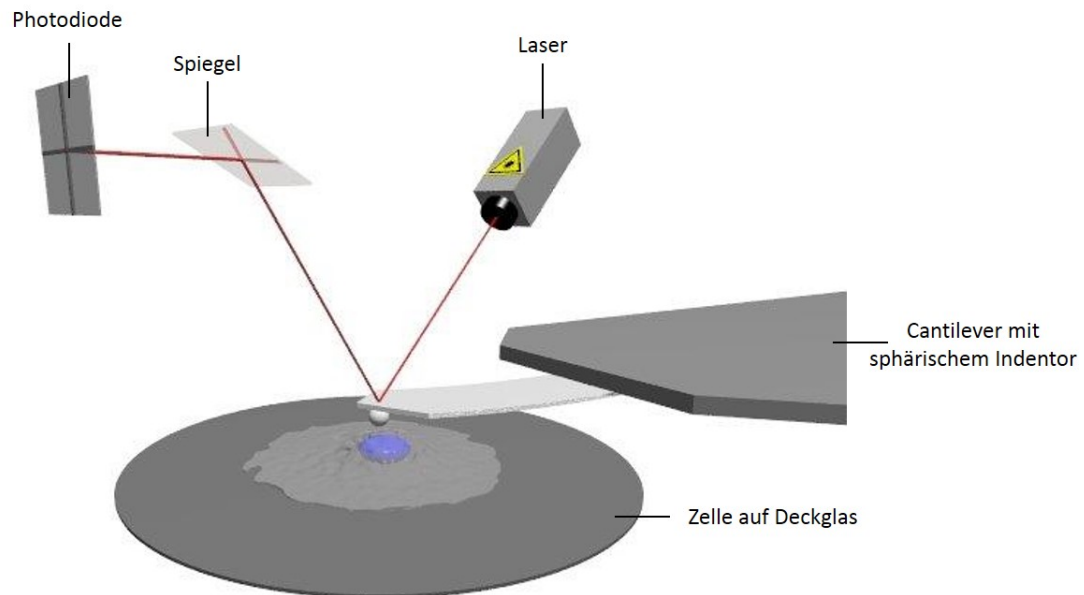


Abbildung 16: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskopes. Verändert nach [106].

2.5.3.1 Durchführung kraftspektroskopischer Messungen

Neben den bildgebenden Modi wird das Rasterkraftmikroskop auch zur Analyse mechanischer Probeneigenschaften genutzt. In den hierfür verwendeten kraftspektroskopischen Messungen wird nicht die gesamte Probe mittels Cantilever abgerastert, sondern der Cantilever an bestimmten Positionen mit einer definierten Kraft auf die Probe abgesenkt. Auf diese Weise werden Kraft-Abstands-Kurven aufgezeichnet, bei welchen die Auslenkung des Cantilevers gegen die z-Position des Piezoelements aufgetragen wird.

Für die Aufzeichnung von Kraft-Abstands-Kurven wird der Cantilever mit einem geringen Abstand über der Probe positioniert. Die Aufzeichnung beginnt mit dem Absenken des Cantilevers bis zum Erreichen des initialen Kontaktpunktes von Cantilever und Probe. Bis zu diesem Zeitpunkt kommt es zu keiner Auslenkung des Cantilevers. Anschließend indentiert der Cantilever mit einer zuvor definierten Auflagekraft in die Probe, was zu einer Auslenkung führt, bevor er anschließend wieder angehoben und in die Ausgangsposition zurückgefahren wird. Hierbei kann es aufgrund von Adhäsionen zwischen Cantilever und Probe zu einer entgegengesetzten Auslenkung des Cantilevers kommen. Sobald die Federkraft des Cantilevers die Adhäsion übersteigt, löst er sich von der Probe und springt in seine Ausgangsposition zurück (siehe Abbildung 17).

Auf harten Substraten besteht eine lineare Beziehung zwischen Absenken und Auslenkung des Cantilevers. Über die Federkonstante (k_c) des Cantilevers ist die Auflagekraft ($F(z)$) linear mit der Cantileverauslenkung ($\delta(z)$) verbunden.

$$F(z) = k_c \cdot \delta(z) \quad (1)$$

Bei der Indentation in weiche Substrate kann es zu einem Einsinken des Cantilevers in die Probe kommen, bevor er eine Auslenkung erfährt, welche auf der Photodiode detektiert werden kann. Die hieraus resultierenden Kurven zeigen eine Krümmung und eine deutlich flachere Steigung. Die Position des Cantilevers (d) muss in diesen Fällen korrigiert werden und ergibt sich aus der Längenänderung des Piezoelements (z) und der Indentation in die

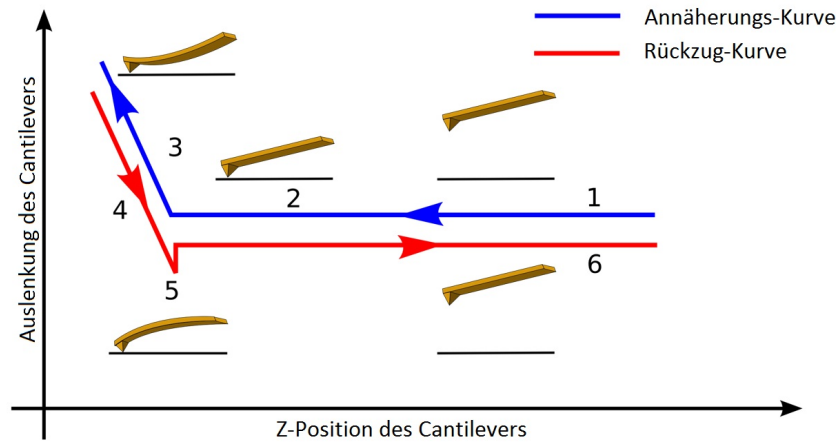


Abbildung 17: Schematische Darstellung einer Kraftkurve. In blau ist die Annäherungskurve des Cantilevers zum Substrat dargestellt, in rot die Rückzugskurve des Cantilevers. Vor dem Kontaktpunkt (2) findet keine Auslenkung des Cantilevers statt. Nachdem Cantilever und Substrat in Kontakt sind (3), führt jede weitere Absenkung des Cantilevers zu einer Auslenkung. Beim Anheben des Cantilevers von der Probe (4) kann es aufgrund von Adhäsionskräften zu einer Verbiegung des Cantilevers entgegen der ursprünglichen Auslenkung kommen (5). Erst wenn die Federkraft des Cantilevers die Adhäsionskraft übersteigt, löst sich der Cantilever vom Substrat und springt in seine Ursprungsposition zurück (6). Verändert nach [107].

Probe (δ).

$$d = z - \delta \quad (2)$$

Die so aufgezeichneten Kraftkurven dienen der Berechnung des Elastizitätsmoduls der Probe.

2.5.3.2 Das Hertzmodell zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls

Für die Bestimmung von Materialeigenschaften wie dem Elastizitätsmodul aus den Kraftkurven wurden verschiedene Modelle beschrieben, allen voran das Hertzmodell. Ursprünglich beschreibt das Hertzmodell die Berührung zweier glatter Kugeln aus elastischem, isotropen und homogenen Material und gibt Aufschluss über die geometrische Beziehung zwischen Kraft und Deformation [108]. Hier beschreibt es die Beziehung für kleine, reibungsfreie Indentationen eines steifen, sphärischen Indentors in ein homogenes,

perfekt-elastisches, isotropes Substrat. Es setzt voraus, dass der Kontaktradius (und somit die Deformation) deutlich kleiner ist als der eigentliche Radius des Indentors und es zu keinerlei Wechselwirkung zwischen den beiden Kugeln kommt. Die vom Hertzmodell postulierten Voraussetzungen über die mechanischen Eigenschaften werden von kaum einer biologischen Probe erfüllt. Besonders Zellen weisen eine komplexe, stark heterogene, nicht isotrope Zusammensetzung auf und es kann durchaus zu Wechselwirkungen mit dem Indentor kommen. Aufgrund dieser Diskrepanzen wurde für die Analyse der Zellelastizität in dieser Arbeit nicht das Hertzmodell, sondern ein institutseigener Algorithmus verwendet, welcher unter

Abschnitt 2.5.3.1 auf Seite 48 näher beschrieben wird .

2.6 Analyse zellulärer Adhäsionen

2.6.1 Einfluss von Substratelastizität und -beschichtung auf das Zytoskelett von Keratinozyten

Da die Proteinzusammensetzung und Elastizität der Umgebung der Zellen einen entscheidenden Einfluss auf ihre mechanischen Eigenschaften hat, wurden das Zytoskelett von Keratinozyten auf harten und weichen Substraten mit unterschiedlichen Proteinbeschichtungen verglichen. Hierfür wurden 10.000 VincCtrl-Zellen auf elastischen Substraten sowie Glas kultiviert und ihr Zytoskelett anschließend immunzytochemisch gefärbt. Für die Herstellung elastischer Oberflächen wurde Polydimethylsiloxan im Mischungsverhältnis 1:10 und 1:40 angemischt und ein Tropfen des entgasten Elastomers auf ein ca. 80 μm dickes Deckglas (20 x 20 mm, Typ #00, Menzel-Gläser) gegeben. Mittels Rotationsbeschichtung wurde, durch eine Drehgeschwindigkeit von 1800 Umdrehung pro Minute und eine Beschleunigung von einer Sekunde, eine 80 μm dicke PDMS Schicht gleichmäßig auf das Deckglas aufgetragen. Das beschichtete Deckglas wurde anschließend unter eine Lochschale geklebt. Die Kreuzvernetzung erfolgte wie zuvor beschrieben. Die elastischen Substrate sowie vergleichende Glassubstrate wurden anschließend jeweils mit 125 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ einer Fibronektinlösung (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder einer Kollagenlösung (48 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für eine Stunde bei 37 °C beschichtet. Die Aussaat der VincCtrl-Zellen erfolgte mit einer Zelldichte von 2.500 Zellen/ cm^2 . 18 Stunden nach Aussaat wurden die Zellen fixiert und die Proteine

Aktin und Vinculin immunzytochemisch gefärbt (siehe 2.4 auf Seite 43).

2.6.2 Veränderung der Kolo-kalisation von Paxillin und Vinculin unter Kalziumeinfluss

Die Veränderung der Adhäsionsstrukturen unter Kalziumeinfluss und die Translokation von Vinculin wurden immunzytochemisch näher analysiert. Hierfür wurden VincCtrl-Zellen mit einer Zelldichte von 2.500 Zellen/cm² für Einzelzellanalysen und 23.000 Zellen/cm² für Analysen an konfluenten Zellschichten auf Glassubstrate ausgesät. 18 Stunden nach Aussaat wurde die Kalziumkonzentration des Zellkulturmediums für 0, 2, 6, bzw. 24 Stunden auf 1,8 mM erhöht. Mittels immunzytochemischer Färbung wurden anschließend die Proteine Paxillin und Vinculin markiert und ihre Kolo-kalisation für die verschiedenen Kalziuminkubationszeiten analysiert. Der hierfür verwendete Algorithmus wurde von G. Dreissen (ICS-7) entwickelt und wird im Folgenden näher beschrieben.

Für die Kolo-kalisation von Paxillin und Vinculin wurden am konfokalen Mikroskop Immunfluoreszenzaufnahmen der apikalen und der basalen Ebene der Zellen gemacht. Die Aufnahmen der Doppelfärbung von Vinculin und Paxillin wurden anschließend kanalspezifisch ausgewertet. Die Pixelgröße betrug 0,094 µm x 0,094 µm. In einem ersten Schritt des Algorithmus wurden die Bilder mittels eines Gaussfilters mit einer Standardabweichung (0,5 Pixel) geglättet. Anschließend wurde mit Hilfe eines Mittelwertfilters von 45 x 45 Pixeln (4,23 µm x 4,23 µm) der lokale Mittelwert sowie die lokale Standardabweichung für jedes Pixel bestimmt. Es folgte die Berechnung des Z-scores, indem (für jedes Pixel) vom Grauwert des Originalbildes der lokale Mittelwert abgezogen und das Ergebnis durch die lokale Standardabweichung geteilt wurde. Diese Normierung der Bilder ermöglicht einen besseren Vergleich verschiedener Aufnahmen miteinander.

Anschließend wurden die Fokaladhäsionen vom Hintergrund segmentiert, indem alle Bereiche mit einem Z-score Wert größer 1 als Fokaladhäsion markiert wurden (siehe Abbildung 18B). Bereiche der Fokaladhäsionen mit einer Fläche von weniger als 45 Pixeln (0,3976 µm²), bzw. mehr als 1000 Pixeln (8,8 µm²) wurden verworfen (siehe Abbildung 18C). In einem nächsten Schritt wurden zusätzlich noch alle Bereiche verworfen, die einen zu geringen Kontrast zu ihrem direkten Hintergrund aufwiesen. Hierfür wurde der mittlere

Grauwert jeder einzelnen Fokaladhäsion im Originalbild bestimmt. Per morphologischer Dilatation wurde die Maskierung der Fokaladhäsion solange erweitert, bis ihre Fläche mindestens zweimal so groß war, wie die der ursprünglichen Struktur. Nach Abzug der Ursprungsmaske wurde auch von dieser Maske der mittlere Grauwert bestimmt. Benachbarte Fokaladhäsionen wurden hierbei aus der vergrößerten Maske ausgeschlossen. Es wurde das Verhältnis des mittleren Grauwerts der Fokaladhäsionen zum mittleren Grauwert der erweiterten Maske bestimmt. Lag dieses nicht über dem Schwellenwert von 1,8, so wurde die Struktur verworfen (siehe Abbildung 18D). Anschließend wurde die Gesamtmenge der detektierten Strukturen bestimmt. Zusätzlich wurde der Überlappungsbereich der gefundenen Vinculin- und Paxillinstrukturen für die Bilder der apikalen und basalen Ebene für die verschiedenen Kalziuminkubationszeiten bestimmt.

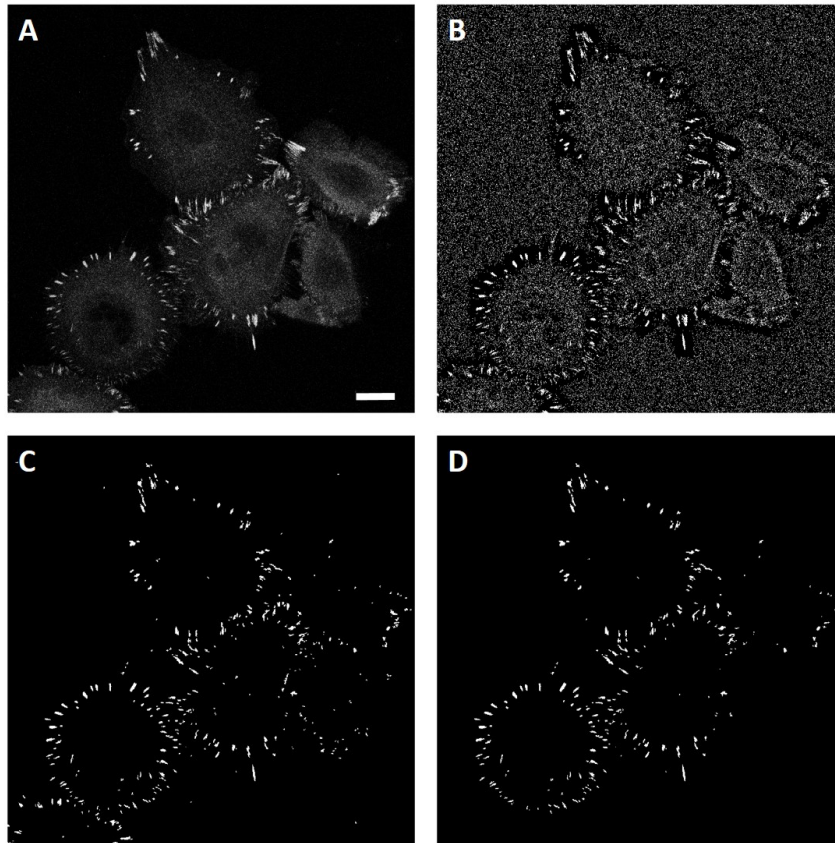


Abbildung 18: Segmentierung/Detektion von Fokaladhäsionen am Beispiel einer Immunfluoreszenzaufnahme des Paxillinsignals in VincCtrl-Zellen (A) Immunfluoreszenzfärbung von Paxillin in VincCtrl-Zellen. In (B) sind alle Pixel weiß dargestellt, welche einen Z-Score größer 1 aufweisen. Alle anderen Pixel sind schwarz dargestellt. (C) Alle Objekte kleiner 45 Pixel und größer 1000 Pixel wurden entfernt. In (D) wurden zusätzlich alle Strukturen entfernt, welche ein zu niedriges Kontrastverhältnis zu ihrer Umgebung auswiesen und den Schwellenwert von 1,8 unterschritten. Maßstab 20 µm.

2.6.3 Analyse von Fokaladhäsionen unter Kalziumeinfluss

Während der zuvor beschriebene Algorithmus dazu dient, den Überlappungsbereich des Vinculin- und Paxillinsignals zu bestimmen und die Translokation des Vinculins in die apikale Zellebene zu detektieren, dient ein weiterer ebenfalls von G. Dreissen (ICS-7) entwickelter Algorithmus dazu, die Veränderung der basalen Adhäsionsstrukturen anhand des Paxillinsignals zu bestimmen. Hierfür wurden VincCtrl-Zellen wie unter 2.4 auf Seite 43 beschrieben behandelt und in konfokalen Immunfluoreszenzaufnahmen der Zellen unter Kalziuminkubation die fokalen Adhäsionsstrukturen anhand des Paxillinsignals bestimmt. Die Detektion der Strukturen erfolgt wie in 2.6.2 auf Seite 51 beschrieben. Im Unterschied zum zuvor beschriebenen Algorithmus erfolgte die Auswertung der Fokaladhäsionen nun jedoch nicht bildspezifisch sondern zellspezifisch. Hierfür wurden die Zellen in einem weiteren Schritt manuell umrandet und nur Strukturen ausgewertet, welche innerhalb der Zellumrandung lagen. Anschließend wurde für jede Zelle die Gesamtfläche der Fokaladhäsionen, der Bedeckungsgrad der Zelle mit Fokaladhäsionen sowie die Anzahl und mittlere Größe der Fokaladhäsionen pro Zelle berechnet.

2.6.4 Analyse des Aktinnetzwerkes unter Kalziumeinfluss

Die Aktinlokalisierung innerhalb der Zelle verändert sich durch die Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration. Um diese Veränderung quantitativ analysieren zu können, wurde der Aktin-Anordnungs-Parameter eingeführt, welcher zwischen einer peripheren und einer zentralen Aktinverteilung unterscheidet. Für die Bestimmung dieses Parameters wurde die Aktinlokalisierung innerhalb von Zellen anhand von Immunfluoreszenzfärbungen des Aktinnetzwerkes in konfluenten Zellschichten in Ab- und Anwesenheit von Kalzium bestimmt. Hierzu wurden in den Aufnahmen die Zellgrenzen manuell markiert, um die einzelnen Zellen voneinander zu separieren. Anschließend wurde jede Zelle auf einen Einheitskreis projiziert. Dadurch wurden Einheitszellen mit einem Radius von 200 Pixeln ($38,8\text{ }\mu\text{m}$) erzeugt. Ausgehend vom Zentrum wurde jede Einheitszelle in Ringe mit einer Breite von fünf Pixeln ($0,97\text{ }\mu\text{m}$) unterteilt und der mittlere Grauwert der Ringe anhand des Aktinsignals bestimmt. An die mittleren Grauwerte wurde anschließend eine Grade angepasst und über die Steigung der Graden der Aktin-Anordnungs-Parameter bestimmt. Dieser weist für Zellen, deren Aktinkonzentration peripher höher ist als zentral positive Werte und für Zellen, bei welchen die Aktinkonzentration zentral am höchsten ist, negative

Werte auf (siehe Abbildung 19).

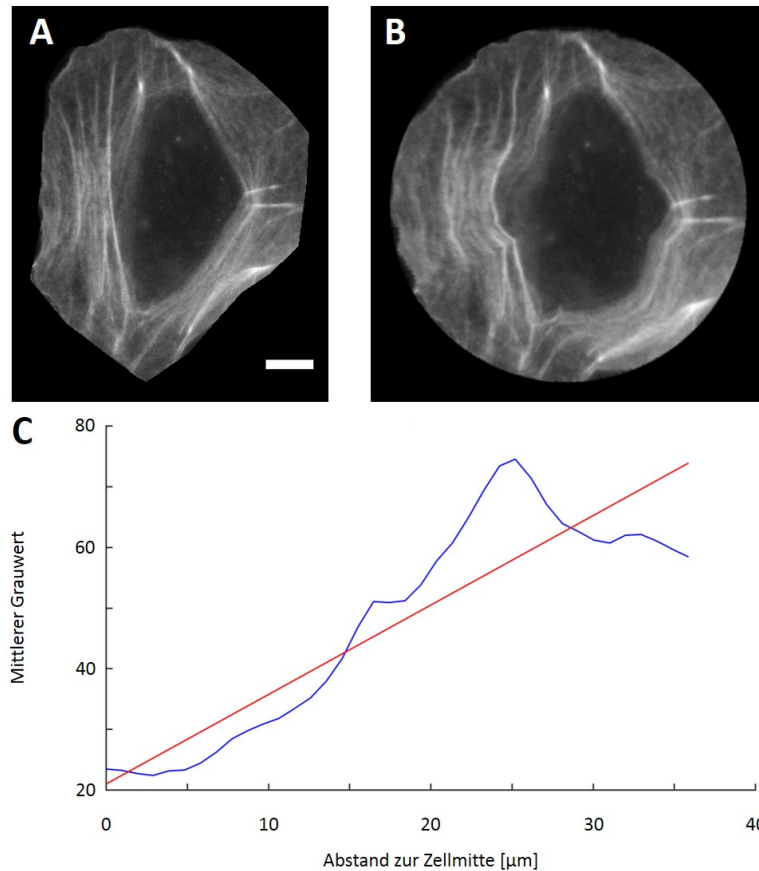


Abbildung 19: Analyse der intrazellulären Aktinfaserverteilung (A) Immunfluoreszenzfärbung des Aktinnetzwerkes. In (B) wurde das Aktinnetzwerk der Zelle auf einen Einheitskreis projiziert. (C) zeigt den mittleren Grauwert des Aktinsignals vom Zellzentrum zur Zellperipherie, in rot ist die Anpassung einer Gradienten an die Grauwertverteilung dargestellt. Maßstab 10 µm.

2.6.5 Korrelationsanalysen von membranständigen desmosomalen Strukturen und zytoskelettalen Keratinaggregaten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Ausbildung von Adhärenzstrukturen eine stabilisierende Wirkung auf das Keratinnetzwerk hat. Gleichzeitig ist das Keratinnetzwerk für die Lokalisation von Desmosomen verantwortlich. Immunfluoreszenzaufnahmen von KTyI/-K14R131P-Zellen zeigen, dass die Ausbildung von zytoplasmatischen Keratinaggregaten in diesen Zellen mit einer verminderten Lokalisation von desmosomalen Struk-

turen entlang der Zellgrenzen einhergeht. Anhand von Korrelationsanalysen zwischen Keratinaggregaten und der Lokalisation von Desmosomen wurden diese Beobachtungen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Magin (Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig) näher untersucht. Hierfür wurden KTyIWT-, KTyI/- - und KTyI/-K14R131P-Zellen in der Arbeitsgruppe Magin fixiert, immunzytochemisch gefärbt und anschließend mikroskopiert. Die Korrelationsanalysen erfolgten anhand der Immunfluoreszenzaufnahmen von Desmoplakin (DP) und Keratin 14 (K14) im Forschungszentrum Jülich.

Durch Subtraktion der mittels 9×9 Pixel und 57×57 Pixel (Pixelgröße $0,161 \mu\text{m}^2$) großen Binomialfilters geglätteten DP-Immunfluoreszenzaufnahmen erhält man ein bandpassgefiltertes Bild. Für jedes Pixel dieses Bildes wurden in einer 91×91 Pixel großen Umgebung der lokale Mittelwert und die lokale Standardabweichung bestimmt. Die Berechnung des Z-Scores erfolgte durch Subtraktion des lokalen Mittelwertes vom Grauwert des Originalbildes und anschließender Normalisierung durch Division der lokalen Standardabweichung. Alle Bereiche mit einer Mindestgröße von fünf Pixeln (Pixelgröße $0,161 \mu\text{m}^2$) und einem Z-Score-Schwellwert größer 0,9 wurden als desmosomale Strukturen markiert. Zytoplasmatisches Desmoplakinsignal war für die nachfolgende Analyse nicht von Bedeutung, da nur desmosomale Strukturen entlang der Zellgrenzen in die weitere Auswertung mit einfließen.

Für die Maskierung der Keratinaggregate wurden sowohl das DP-, als auch das K14-Fluoreszenzbild zunächst mit einem 3×3 Pixel großen Binomialfilter geglättet. Durch Subtraktion des DP-Bildes vom K14-Bild wurde anschließend ein Differenzbild erstellt, von welchem der mittlere Grauwert berechnet wurde, wobei in die Berechnung nur Pixel einfließen, welche einen Grauwert von mindestens 0 aufwiesen. Alle Pixel, deren Grauwert den mittleren Grauwert überstieg, wurden als K14-Aggregate markiert. Anhand der zuvor eingezeichneten Zellgrenzen konnte für jede Zelle der Bedeckungsgrad mit Keratinaggregaten bestimmt werden, welcher sich aus dem Verhältnis von Zellfläche und Aggregatfläche ergibt. Zellen mit einem Bedeckungsgrad über 4% wurden der Gruppe 1 (viele Aggregate) zugeordnet, Zellen mit einem Bedeckungsgrad von weniger als 4% der Gruppe 2 (wenig Aggregate). Es folgte die Einteilung der Zellgrenzen in drei Kategorien. Hierbei wurde zwischen Zellgrenzen zwischen zwei Zellen mit wenigen Aggregaten, zwei Zellen mit vielen Aggregaten und zwischen einer Zelle mit wenigen und einer Zelle mit vielen Aggregaten unterschieden (siehe Abbildung 20).

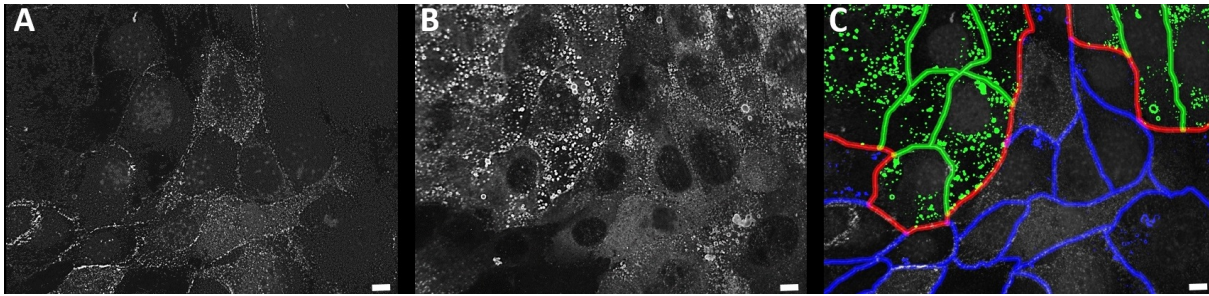


Abbildung 20: Korrelationsanalyse von Desmosomen und Keratinaggregaten in KTyI-/-K14R131P-Zellen. Immunfluoreszenzfärbung von Desmoplakin (A) und Keratin 14 (B). Überlagerung der Desmoplakinfluoreszenzaufnahme mit manuell eingezeichneten Zellgrenzen mit den vom Algorithmus detektierten Keratinstrukturen. (C) Grün dargestellte Keratinaggregate bedecken mehr als 4% der Zellfläche, blau dargestellte Aggregate bedecken weniger als 4%. Die farbliche Markierung der Zellgrenzen kennzeichnet in grün Zellgrenzen zwischen zwei Zellen mit vielen Keratinaggregaten, in blau Zellgrenzen zwischen zwei Zellen mit wenigen Aggregaten und in rot Grenzen zwischen einer Zelle mit wenigen und einer mit vielen Aggregaten. Maßstab 10 μm .

Zellgrenzen von weniger als 10 Pixeln wurden verworfen. Per morphologischer Dilatation wurden die Zellgrenzen anschließend um 10 Pixel in alle Richtungen verbreitert. Von diesen verbreiterten Zellgrenzen wurde der Flächeninhalt sowie der Bedeckungsgrad mit den zuvor markierten desmosomalen Strukturen bestimmt.

2.7 Analyse der Aktinreorientierung nach zyklischer Dehnung

Die Analyse zellulärer Antworten auf zyklische Dehnung erfolgte mit Hilfe von elastischen Silikonkautschuk-Kammern. Die Herstellung dieser Kammern wurde mit Hilfe von Gussformen durchgeführt und ist detailliert in [84] beschrieben. Die verwendeten Gussformen sind dreiteilig und bestehen aus einer quadratischen, metallenen Bodenplatte sowie zwei Polystyrolformen. Die erste der beiden Polystyrolplatten liegt direkt auf der Bodenplatte. Sie weist mittig ein planares Plateau und in jeder Ecke einen zylinderförmigen Stift auf. Die Stifte stellen spätere Aussparungen dar, mittels welcher die Silikonkautschuk-Kammer in einen Halterahmen eingebaut werden kann. Die zweite PVC-Platte wird auf die erste Platte gelegt und bildet den Rahmen der Gussform. Alle drei Teile werden in den Ecken mit jeweils einer Schraube aneinander befestigt (siehe Abbildung 21).

Die zusammengebauten Gussformen wurden exakt bis zur Oberkante mit nicht kreuzver-

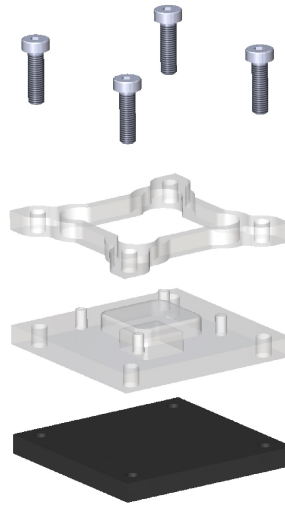


Abbildung 21: Schematische Darstellung einer Gussform für elatische Zugkammern.
Abbildung von J. Konrad (ICS-7).

netztem, entgastem 1:40 Elastomergemisch befüllt. Hierbei entstandene Luftblasen wurden mit Hilfe einer Kanüle entfernt. Durch Zerlegen der Gussform in ihre Einzelteile konnte die ausgehärtete Kammer anschließend freigelegt und entnommen werden. Die so entstandene Kammer stellt einen Negativabdruck der Gussform dar und kann zur Kultivierung von Zellen verwendet werden. Das Plateau der Gussform bildet hierbei eine 2 cm x 2 cm große Vertiefung, in welcher die Zellen ausgesät und Zellkulturmedium kultiviert werden können. Die Dicke des Kammerbodens beträgt 400 μm , wodurch lichtmikroskopische Analysen der Zellen möglich sind.

Die zyklische Dehnung der Elastomerkammern erfolgte mit Hilfe einer motorisierten Zelldehnungsapparatur, welche von W. Rubner im ICS-7 entwickelt wurde. Der computergesteuerte Schrittmotor der Apparatur wurde über eine von W. Hürttlen (ICS-TA) entwickelte Software angesteuert. Die Zugkammer erfährt hierbei eine Dehnung in X-Richtung und eine geringe Stauchung in Y-Richtung, welche durch den Kammerrahmen reduziert wird. Eine detaillierte Beschreibung der Kammerdeformation unter Zug ist in [84] beschrieben.

Die Zugkammer wurde in der Grundposition (englisch: *Zero-Position*) der Zelldehnungsapparatur spannungsfrei eingebaut und an zwei gegenüberliegenden Seiten mit Klemm-

plättchen und Muttern fixiert. Um beim Befüllen der Kammer mit Zellkulturmedium ein Durchhängen des Bodens zu verhindern, wurde der Schrittmotor anschließend um 1,5 mm in eine vorgedehnte Position verfahren, wodurch die Kammer die nötige Vorspannung erfuhr. In dieser vorgedehnten Position wurden die Zugkammern für eine Stunde mit 125 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Fibronectinlösung (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beschichtet und die Zellen in den entsprechenden Zellzahlen ausgesät. Für Dehnungsexperimente an Einzelzellen wurden 2.125 Zellen/ cm^2 für VincCtrl, ECadCtrl, ECadKO und αCatKD -Zellen sowie 2.500 Zellen/ cm^2 für VincKO-Zellen ausgesät. Für Analysen an konfluenten Zellschichten wurden 21.250 Zellen/ cm^2 für VincCtrl, ECadCtrl, ECadKO und αCatKD -Zellen und 27.500 Zellen/ cm^2 für VincKO-Zellen auf die Zugkammern gegeben. Zur Analyse von Einzelzellen sowie konfluenten Zellschichten unter Kalziumeinfluss wurden die entsprechenden Zellen zwei Stunden vor Beginn des Experiments mit Medium mit einer Kalziumkonzentration von 1,8 mM inkubiert und auch während des Experiments unter diesen Bedingungen gehalten.

Für Dehnungsexperimente an KTyIWT-, KTyI/- -, KTyI/-K14- und KTyI/-K14R131P-Zellen wurden die Zugkammern mit 125 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ einer Kollagenlösung (48 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beschichtet und die Zellen anschließend mit einer Dichte von 37.500 Zellen/ cm^2 ausgesät. Das Bedecken der Kammer mit einem Deckglas sowie einem Parafilm-Streifen reduzierte Kontaminationen und die Evaporation des Zellkulturmediums.

Zwischen 18 und 48 Stunden nach Aussaat wurden die Zugexperimente zur Analyse der zytoskelettalen Reorientierung durch zyklische Dehnung durchgeführt. Hierbei wurden die Kammern über verschieden lange Zeiträume uniaxial, zyklisch gedehnt. Die Frequenz, Amplitude und Dauer der Dehnung variierten zwischen den Experimenten (siehe Tabelle 20). Eine Amplitude von 3 mm entspricht hierbei einer Dehnung der Zellen von 14%, eine Amplitude von 8,9 mm entspricht 40%. Da die Signalform für zyklische Dehnung als sinusoidaler Verlauf beschrieben wird [109], es sich bei dem hier angelegten Reiz jedoch um einen trapezförmigen Reiz handelt, wurden die Fahr- und Pausenzeiten durch Anpassung der Parameter bestmöglich an einen sinusoidalen Verlauf angeglichen.

Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Parameter für Dehnungsexperimente

Experiment	Frequenz [mHz]	Amplitude [mm]	Geschwindigkeit [mm/s]	Pause [s]
Vergleichende Aktinfaserreorientierung an Einzelzellen und konfluenten Zellschichten	300	3	2,4	0,417
Frequenzabhängige Reorientierung des Aktinnetzwerkes	100	3	0,8	1,25
Frequenzabhängige Reorientierung des Aktinnetzwerkes	300	3	2,4	0,417
Frequenzabhängige Reorientierung des Aktinnetzwerkes	600	3	4,8	0,208
Analyse zytoskelettaler Netzwerke nach zyklischer Dehnung	4000	3	32,0	0,03

Zur Bestimmung der Zytoskelettorientierung als Antwort auf mechanische Reize wurde das Aktinnetzwerk der Zellen nach zyklischer Dehnung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin markiert. Um die Zellen auf Zugkammern fluoreszenzmikroskopisch analysieren zu können, wurde ein Objektträger unter den Kammerboden gehaftet. Nach Aushärten des Eindeckelmediums über Nacht konnte der eingedeckelte Kammerboden am nächsten Tag mit Hilfe eines Skalpells aus dem Halterahmen herausgetrennt werden.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen der Proben wurden anschließend an einem Inversmikroskop (Axiover Observer Z.1, Carl Zeiss) mit einem 40 x EC-Plan Neofluar Ölobjektiv

(Ph3/1,3 NA) aufgenommen. Als Lichtquelle diente eine Xenon-Hochdrucklampe mit einem Wellenlängenspektrum von 300-700 nm (300W, Lambda DG-4, Shutter Instruments). Die optischen Aufnahmen wurden mit Hilfe einer EM-CCD-Kamera (Typ C9100, Hamamatsu, Japan) in digitale Bilder umgewandelt. Die Orientierungsanalysen wurden mit einer von G. Dreissen (ICS-7) entwickelten Software (MATLAB 9.0) durchgeführt, die im Folgenden näher beschrieben wird:

Zunächst wurde für das Fluoreszenzbild anhand eines 2D Strukturensors nach Bigun et al. 1987 die Orientierung eines jeden Pixels mittels eines gradientenbasierten Verfahrens bestimmt. Hierfür wird anhand des Grauwertverlaufs in X- und Y-Richtung jedem Pixel ein Orientierungsvektor zugeordnet. Da in die Auswertung jedoch ausschließlich die Orientierung des Zytoskeletts einfließen soll, wurden in einem weiteren Schritt die Zellflächen maskiert, um alle Strukturen außerhalb der Zelle auszuschließen. Für die Analyse der Zytoskelettorientierung muss zunächst jede Zelle einzeln maskiert werden. Bei einzeln liegenden Zellen erfolgt die Maskierung automatisiert. Hierfür wird der mittlere Grauwert des gesamten Bildes bestimmt und Strukturen, deren Grauwert den mittleren Grauwert überschreiten als zelluläre Strukturen maskiert. Bereiche, die eine Mindestgröße von 5000 Pixeln ($188,17 \mu\text{m}^2$) unterschreiten, werden nicht berücksichtigt. Freie Bereiche innerhalb der Zellmaskierung werden nachträglich ebenfalls maskiert, sodass die Zellen vollständig erfasst werden. In Bereichen mit konfluenter Zelldichte müssen die Zellen manuell umrandet und so voneinander getrennt werden. Die Zellmaske wurde durch morphologische Erosion um 15 Pixel ($2,9 \mu\text{m}$) verkleinert, sodass die Aktin-Randfasern in der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

Die Fluoreszenzbilder wurden mit einer 7×7 Pixel ($0,194 \mu\text{m} \times 0,194 \mu\text{m}$) großen Binomialmaske geglättet. Anschließend wurde das geglättete Bild vom Originalbild subtrahiert. Zur Rauschminimierung wurde das Bild anschließend erneut mittels einer 7×7 Pixel großen Binomialmaske geglättet. Hierdurch wurden Hintergrundrauschen und homogene Flächen minimiert und Kanten von zytoskelettalen Strukturen hervorgehoben. Alle Bildpunkte, deren Grauwert die Summe aus mittlerem globalem Grauwert und dessen Standardabweichung ($0,5$ Pixel) überschreiten, wurden als zytoskelettale Strukturen angenommen. Bereiche kleiner als $200 \mu\text{m}^2$ wurden hierbei nicht berücksichtigt.

Von den zu Beginn bestimmten Orientierungsvektoren aller Pixel des gesamten Bildes

flossen nur die Bereiche in die spätere Analyse mit ein, welche sich innerhalb einer Zellmaskierung befanden und nach der Bildprozessierung als zytoskelettale Strukturen detektiert wurden. Aus den verbleibenden Orientierungsvektoren wurde für jede Zelle ein separates Histogramm erstellt, aus welchem die Hauptorientierung des Zytoskeletts bestimmt wurde.

2.8 Analyse zellulärer Kräfte

Zellen sind durch Zell-Matrix-Adhäsionen mit ihrem Substrat verbunden und üben über diese Kontaktstellen Kräfte aus, welche zu lokalen Deformationen des Substrates führen. Zelluläre Substratdeformationen können mittels Positionsanalyse fluoreszierender Kugeln in der Substratoberfläche im Mikroskop sichtbar gemacht werden. Aus den Substratdeformationen können die zellulären Kräfte bestimmt werden, was im Folgenden näher beschrieben wird. Da die zellulären Kräfte im nN-Bereich liegen, können lokale Deformationen nur mit einer hohen räumlichen Auflösung und einem ausreichend weichen, deformierbaren Substrat aufgezeichnet werden. Das verwendete Substrat muss zusätzlich eine gute Biokompatibilität und für mikroskopische Analysen eine hohe Transparenz aufweisen. Gleichzeitig muss das Material linear-elastisch und seine Elastizität präzise charakterisierbar sein.

Der in dieser Arbeit verwendete Silikonkautschuk, Polydimethylsiloxan (PDMS), erfüllt diese Bedingungen. Die Einbettung von fluoreszierenden Mikrokugeln in elastische, 15 kPa steife PDMS-Substrate dient dazu, tangentielle Deformationen des Substrates, hervorgerufen durch die Zellen, mit hoher Auflösung zu detektieren. Für die Herstellung dieser Substrate wurden fluoreszierende Mikrokugeln mit einem Durchmesser von 200 nm in ein Elastomergemisch mit einem Mischungsverhältnis von 1:50 (15 kPa) eingebettet. Hierfür wurden 10 μ l einer 2%igen Mikrokugel-Suspension mit 16.100 x g für 7 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Kugeln mit dem zehnfachen Volumen des entgasten, nicht kreuzvernetzen Elastomers vermischt. Das Kugel-PDMS-Gemisch wurde gleichmäßig auf eine Siliziummaske mit regelmäßigen Vertiefungen aufgetragen. Die Erhebungen der Siliziummaske wiesen eine Kantenlänge von 2,5 μ m und eine Höhe von 500 nm auf. Die quadratische Gitterkonstante betrug 3,5 μ m. Durch das Verteilen des PDMS-Kugel-Gemischs wurden die fluoreszierenden Mikrokugeln

gleichmäßig in die Vertiefungen eingerieben. Im Anschluss wurde ein Tropfen kugelfreies Elastomergemisch auf die Maske gegeben. An zwei Seiten der Maske wurden zwei 80 µm hohe Platzhalter platziert, von oben wurde das Elastomer mit einem 80 µm dicken Deckglas bedeckt, wodurch sich eine Elastomerdicke von 80 µm ergab. Der gesamte Aufbau wurde zusätzlich noch mit einem Objektträger beschwert und seitlich mit zwei Klammern zusammengehalten (siehe Abbildung 22). Die Kreuzvernetzung erfolgte für 16 Stunden bei 60 °C. Anschließend konnte das kreuzvernetzte Elastomer mittels hochreinem Isopropanol von der Gussform abgelöst und mit einem 1:10 Elastomergemisch in eine Zellkultur-Lochschale eingeklebt werden. Die Kreuzvernetzung des 1:10 PDMS erfolgte für 2 Stunden bei 60 °C.

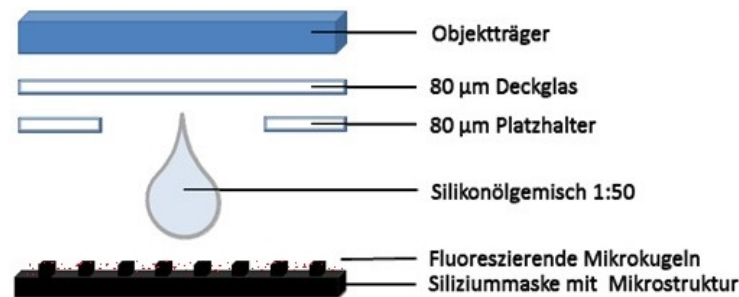


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Herstellung von elastischen Oberflächen mit fluoreszierenden Mikrokugeln.

Vor der Aussaat der shPlectin- bzw. shCtrl-Zellen wurden die elastischen Substrate für zwei Stunden bei 37 °C mit 125 µl/cm² einer Fibronectinlösung (20 µg/ml) beschichtet. Die Aussaat erfolgte 18 Stunden vor der Zellkraftmessung mit einer Zelldichte von 1000 Zellen/cm². Die Zellkraftanalysen wurden an einem Inversmikroskop (Axio Observer Z.1, Carl Zeiss) unter Verwendung eines Ölobjektives mit 40facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1,3 durchgeführt. Die Anregung der fluoreszierenden Mikrokugeln erfolgte mittels Helium-Neon-Lasers mit einer Wellenlänge von 633 nm. Das Inkubationssystem XL S1 ermöglichte eine Durchführung der Lebendzellexperimente bei 37 °C und 5% CO₂. Die verwendete Mikroskop-Software enthielt eine „mark&find“-Funktion, mit welcher sich Positionen speichern und mittels motorisiertem Probentisch automatisch ansteuern lassen. Zur Analyse der Substratdeformation durch die Zelle wurde jeweils vor und nach dem Ablösen der Zellen eine Aufnahme der fluoreszierenden Kugeln gemacht. Das Bild der Kugeln nach dem Ablösen der Zellen stellt ein Referenzbild zum deformierten Substrat vor dem Ablösen der Zellen dar. Aus der Verschiebung der Mikrokugeln kann anschließend die Kraft, welche die Zelle auf das Substrat ausübt, abgeschätzt werden.

Die gesamte Probe wurde mäanderförmig abgerastert. Positionen einzeln liegender, aufgespannter Zellen wurden gespeichert und ein Phasenkontrastbild der Zelle sowie ein Fluoreszenzbild der Mikrokugeln im Substrat aufgenommen. Anschließend wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen für 30 Minuten mit Trypsin-EDTA inkubiert, was zum Ablösen der Zellen vom Substrat führte. Das Trypsin-EDTA wurde abgenommen und gegen PBS ersetzt. Die zuvor gespeicherten Positionen wurden erneut vermessen, um ein Referenzbild der fluoreszierenden Kugeln im Substrat ohne Deformation durch die Zellen aufzunehmen.

Für die Abschätzung der Zellkräfte wurde das von N. Kirchgeßner und S. Houben im ICS-7 entwickelte Computerprogramm „CellForceAnalysis“ verwendet. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden individuelle Änderungen des Programms von Dr. R. Springer (ICS-7) implementiert. Zur Bestimmung der lokalen, tangentialen Deformationen müssen zunächst die Positionen der fluoreszierenden Mikrokugeln bestimmt und Verschiebungen der Probe während der Messung korrigiert werden. Hierfür wurde in der obersten Substratschicht manuell eine Kugel umrandet. Die Positionsanalyse der weiteren Kugeln erfolgte durch normierte Kreuzkorrelation des zuvor ausgewählten Bildausschnitts einer Kugel mit dem gesamten Bildbereich. Hierbei wurden lokale Maxima des Kreuzkorrelationskoeffizienten, welche einen Schwellenwert von 0,7 überschritten, als Positionen weiterer Kugeln angenommen. Aufgrund der längeren Inkubationszeit sowie der mehrfachen Medienwechsel kann es zwischen den einzelnen Aufnahmen (mit und ohne Deformation) zu leichten Verschiebungen der Probe kommen. Eine Korrektur dieser Verschiebung vor der Bestimmung der Substratdeformation ist deshalb unerlässlich, um Artefakte zu eliminieren und eine verschiebungsunabhängige Substratdeformation der Zelle analysieren zu können.

Die Driftkorrektur erfolgte anhand von Substratbereichen, welche außerhalb des Deformationsfeldes der Zelle lagen und deshalb als unbeeinflusst angenommen werden können. In diesen Bereichen wurden mindestens drei rechteckige Bildausschnitte manuell markiert und mit Hilfe der normierten Kreuzkorrelation im Referenzbild analysiert. Aus den so bestimmten Verschiebungen wurde der Mittelwert der verschiedenen Bildausschnitte bestimmt und als Verschiebung des gesamten Bildbereichs angenommen. Die Aufnahmen wurden anschließend automatisch driftkorrigiert. Zur Bestimmung der Substratdeformation durch die Zellen wurde der Positionsunterschied der fluoreszierenden Mikrokugeln vor und nach dem Ablösen der Zellen bestimmt. Da die Verschiebung anhand einer Ku-

gel kaum nachvollziehbar ist, wurde hierfür eine Schablone generiert, welche die Kugeln in ihrer spezifischen Umgebung zeigt. Die Kugeln in der Umgebung der zu verfolgenden Mikrokugel bilden hierbei für jede Kugel ein einzigartiges Muster, welches wie eine Art Fingerabdruck fungiert und sich in jedem Bild wiederfinden lässt. Durch Kreuzkorrelation kann so die Position einer jeden Schablone präzise bestimmt werden. Aus den Mittelpunkt der Schablonen ergeben sich so Verschiebungsvektoren für jede Mikrokugel, die sich im Zentrum der Schablone befindet. Anhand von Verschiebungsvektoren können aus den Positionsunterschieden der Kugeln die kontraktile Zellkräfte abgeschätzt werden [110]. Die Summe aller wirkenden Kraftkomponenten innerhalb dieses Bereichs ergab hierbei die kontrahierende Gesamtkraft der Zelle.

2.9 Kraftspektroskopische Messungen an lebenden Zellen

Die Elastizitätsmessungen an lebenden Zellen wurden mittels Rasterkraftmikroskopie durchgeführt. Hierfür wurden die KTyIWT-, KTyI/- -, KTyI/-K14- und KTyI/-K14R131P-Zellen mit einer Dichte von 1.050 Zellen/cm² für Einzelzellmessungen und 8.900 Zellen/cm² für Analysen an konfluenten Zellschichten 48 Stunden vor der Messung auf Glassubstrate ausgesät. Für Experimente unter Kalziumeinfluss wurden die Zellen 24 Stunden nach Aussaat für 24 Stunden in Medium mit 1,2 mM Kalzium kultiviert.

Die A431 Zellen wurden mit einer Dichte von 6.250 Zellen/cm² ausgesät und 24 Stunden vor der Messung in serumfreien Medium kultiviert. Unmittelbar vor dem Experiment wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und in 2 ml HEPES-Zellkulturmedium inkubiert. Die Elastizitätsmessungen wurden bei Raumtemperatur an einem NanoWizar II Rasterkraftmikroskop in der Life Science Version der Firma JPK durchgeführt. Die Kombination mit einem inversen Mikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss) ermöglichte die optische Kontrolle der Zellvitalität sowie der Positionierung des Cantilevers. Verwendet wurde hierfür ein Luftobjektiv mit 10facher Vergrößerung.

Zur Durchführung von vergleichenden Elastizitätsmessungen an lebenden Zellen ist es notwendig, einen flexiblen, sehr elastischen Cantilever zu verwenden, dessen Elastizität vergleichbar mit der der Zellen ist. Nur so kann sichergestellt werden, dass der Cantilever stark genug ist, die Zelle zu indentieren und gleichzeitig sensitiv genug, um be-

reits Indentationen zu messen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden deshalb Cantilever mit einer nominellen Federkonstante von $k=0,04$ N/m und einer Resonanzfrequenz von $f_0=7$ kHz verwendet (Nanoworld ArrowTM TL1AU mit Ti/Au Rückseitenbeschichtung). Eine Rückseitenbeschichtung des Cantilevers mit Ti/Au verbessert das Reflexionsvermögen der Oberfläche für das Laserlicht und erhöht dadurch die Sensitivität des Cantilevers.

Um die lebenden Zellen durch die Indentation während der Messung nicht zu beschädigen, wurden Cantilever mit einer kugelförmigen Spitze gewählt. Hierzu wurde ein Zweikomponenten-Klebersystem (UHU plus Endfest 300) verwendet, um eine Siliziumsphäre ($r = 2,5$ μm , G. Kisker GbR, PSI-0.5, surface plain) unterseitig am vorderen Ende des spitzenlosen Cantilevers zu befestigen. Der exakte Radius der kugelförmigen Cantileverspitze wurde an einem konfokalen Mikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss) mit Hilfe eines 4 x LD Plan Neofluar Ph2 Luftobjektives vermessen. Zur Reduzierung des thermischen Rauschens wurde der Cantilever vor jedem Experiment für ca. 20 Minuten in das (HEPES) Zellkulturmedium eingetaucht, sodass sich ein thermisches Gleichgewicht einstellen konnte.

Da es sich bei Elastizitätsmessungen an lebenden Zellen um sehr sensitive Messungen handelt und Inhomogenitäten oder Veränderungen am Cantilever zu Abweichungen von den Herstellerangaben bezüglich Federkonstante und Sensitivität führen können, ist es von großer Bedeutung, die Federkonstante und Sensitivität des jeweiligen Cantilevers in hoher Genauigkeit vor Durchführung der Messungen zu bestimmen.

Die Federkonstante wird durch die Länge und Geometrie des Cantilevers bestimmt und ist für seine Eigenschaften entscheidend. Die exakte Kalibrierung der Federkonstante erfolgte für jeden Cantilever individuell anhand seines thermischen Rauschspektrums. Zur Aufzeichnung des Spektrums befindet sich der Cantilever etwa 20-50 μm oberhalb des Substrates und wird durch thermische Energie zum Schwingen angeregt. Das Resonanzspektrum des Cantilevers wird für 1-2 Minuten anhand der Laserbewegung auf der Photodiode aufgezeichnet und kann zur Berechnung der Federkonstanten verwendet werden. Die Fluktuationen des Cantilevers werden als Funktion der Frequenz aufgetragen. Hierbei ist die Amplitude bei konstanter Temperatur ausschließlich von der Federkonstante des Cantilevers abhängig. Durch Anpassung einer Lorentzfunktion an die thermische Reso-

nanzkurve kann die Federkonstante bestimmt werden. Das Spektrum zeigt hierbei mehrere Schwingungsmodi des Cantilevers, von welchen normalerweise der erste zur Berechnung verwendet wird. Da sehr weiche Cantilever in Flüssigkeit ein geringes Signal-Rausch-Verhältnis aufweisen, wird in diesem Fall der zweite Schwingungsmodus zur Ermittlung der Federkonstante verwendet.

Neben der Federkonstanten des Cantilevers muss auch die Sensitivität des gesamten Systems bestimmt werden. Hierfür wird das Auslenkungssignal des Cantilevers kalibriert, indem die Auslenkung des Cantilevers für eine definierte am Piezoelement angelegte elektrische Spannung bestimmt wird. Für diese festgelegte Spannung wird die Auslenkung des Cantilevers über die Bewegung des Laserstrahls auf der Photodiode ermittelt. Anhand des linearen Anstiegs der aufgezeichneten Spannungs-Auslenkungs-Kurven auf harten Substraten kann die Sensitivität [nm/V] des Systems bestimmt werden.

Aufgrund von starken Inhomogenitäten durch Zellorganellen und zytoskelettale Bestandteile im Zellkörper wurden in dieser Arbeit sämtliche Elastizitätsmessungen über dem Zellkern durchgeführt. Eine Indentationstiefe von 5-10% der gesamten Zellhöhe darf hierbei nicht überschritten werden, um den Einfluss der Schichtdicke ausschließen zu können. Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurde die Position des Zytoskeletts oberhalb des Zellkerns bestimmt. So konnte sichergestellt werden, dass die Indentationen des Cantilevers ausreichend klein waren, um die Elastizität des Zytoskeletts ohne den Einfluss des Zellkerns bestimmen zu können. Zu Beginn der Messung wurde der Cantilever zentral über einem Zellkern positioniert und anschließend abgesenkt. Die Annäherungsgeschwindigkeit wurde hierbei konstant auf 1,5 $\mu\text{m/s}$ gehalten. Das Absenken erfolgte bis zum Erreichen einer maximalen Auflagekraft von 1,5 nN. Der Cantilever wurde anschließend wieder von der Probe entfernt und zurück in seine Ausgangsposition gefahren. Für den Nachweis der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse wurden an jeder Messstelle drei aufeinanderfolgende Kraftkurven aufgezeichnet.

Für die visuelle Darstellung der Kraftkurven wurde die vertikale Laserauslenkung auf der Photodiode während des Verfahrens des Cantilevers gegen die vertikale Position des Cantilevers in μm aufgetragen. Anschließend erfolgte mit Hilfe der zuvor bestimmten Sensitivität und Federkonstante des Cantilevers die Transformation der Kurve in eine Kraft-Abstands-Kurve. Es folgte die Korrektur der Grundlinie. Da es sich bei Steigungen

der Grundlinie vor dem eigentlichen Probenkontakt meist um Artefakte handelt, wurde die Steigung der Kurve in diesem Bereich von der aufgezeichneten Gesamtkurve subtrahiert und die Grundlinie auf 0 gesetzt. Bei harten, nicht elastischen Substraten führt eine Längenänderung des Piezoelements nach Erreichen des Kontaktpunktes zu einer proportionalen Deformation des Cantilevers. Bei weichen Substraten hingegen führt eine Verlängerung des Piezoelements neben einer Auslenkung des Cantilevers auch zu einer Indentation in das Substrat.

Anhand der zuvor bestimmten Sensitivität des Cantilevers kann aufgrund der Piezobewegung die Indentationstiefe ermittelt und die wahre Höhe des Cantilevers bestimmt werden. Dies ermöglicht eine Höhenkorrektur des Cantilevers (Tip-sample separation). Entscheidend bei der präzisen Analyse der Elastizität ist eine genaue Bestimmung des Kontaktpunktes von Cantilever und Probe. Da es bei der geräteeigenen (JPK DP) Software immer wieder zu Ungenauigkeiten in der Kontaktpunktbestimmung kam, wurde ein eigens im Institut von Dr. R. Springer (ICS-7) entwickelter Algorithmus zur Kontaktpunktbestimmung verwendet. Hierfür wurden die aufgezeichneten Messkurven mit ca. 10^4 Datenpunkten durch Datenreduktion geglättet. Die Kurven wurden hierbei in 100 Intervalle unterteilt und die Datenpunkte innerhalb dieser Bereiche gemittelt. Anhand dieser Mittelwerte wurde eine reduzierte, geglättete Kurve erstellt. Die dritte Ableitung der reduzierten Kurve wurde errechnet und das erste regionale Maximum als Kontaktpunkt identifiziert. Hierbei wurde das Maximum der dritten Ableitung gewählt, da dieses, im Gegensatz zu den Maxima der ersten und zweiten Ableitung vor dem Bereich der Kurvenkrümmung liegt. Es befindet sich im Übergang zwischen kraftfreier Grundlinie und dem Auslenkungsbereich des Cantilevers und kommt dadurch dem Kontaktpunkt von Cantilever und Probe am nächsten. Das Maximum der ersten Ableitung beschreibt den Wendepunkt der Kurve, das der zweiten Ableitung den Bereich der stärksten Krümmung, wodurch beide Ableitungen zur Kontaktpunktbestimmung ungeeignet sind und nur das Maximum einer höheren Ableitung in Frage kommt. Für den Abstand von Cantilever und Probe wurde im Bereich des Kontaktpunktes der Wert auf 0 gesetzt. Die Abstandswerte aller anderen Messpunkte wurden entsprechend angepasst. Für die weitere Auswertung der Zellelastizität wurden nur Bereiche verwendet, welche –ausgehend vom Kontaktpunkt– eine Indentationstiefe von 500 nm nicht überschritten.

Mittels eines Indentationsdiagrammes, bei welchem der Elastizitätsmodul gegen die Indentationstiefe aufgetragen wird, konnte gezeigt werden, dass der Elastizitätsmodul für

diesen Bereich auch bei Variationen des Indentationsbereichs konstant blieb. Für Elastizitätsmessungen an lebenden Zellen ist das Hertzmodell ungeeignet. Aus diesem Grund wurde für die Analyse der Kraftkurven der im Institut eigens von Dr. R. Springer (ICS-7) entwickelte Algorithmus verwendet. Mit Hilfe eines MATLAB-basierten Programms wird hierbei das mathematische Modell eines einfachen Potenzgesetzes an die Messkurven angepasst:

$$F = A \cdot \delta^b \quad (3)$$

Hierbei beschreibt F die Kraft (des Indentors), A die annähernde Steifigkeit, δ die Indentationstiefe (des Indentors) und b den Exponenten. Die Summe der kleinsten quadratischen Abweichungen zwischen dem Modell und der Messkurve wurde mittels numerischem Optimierungsverfahren nach Marquardt-Levenberg-Algorithmus bestimmt. Der Vorfaktor A und der Exponent b des Potenzgesetzes sind hierbei freie Variablen.

2.10 Statistische Analysen

Um die Unterschiede der mechanischen Eigenschaften von Zellen auf Signifikanz zu prüfen, wurde der nicht parametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Ergänzend wurde für die Relevanz des statistischen Effekts die Effektgröße nach Cohen berechnet. Signifikanzniveaus werden wie folgt angegeben:

$$\begin{array}{llll} 0,01 \leq p < 0,05: & * \\ 0,001 \leq p < 0,01: & ** \\ p < 0,001: & *** \end{array}$$

3 Ergebnisse

Die mechanischen Eigenschaften von Zellen werden durch die drei zytoskelettalen Komponenten Mikrotubuli, Mikrofilamente und Intermediärfilamente bestimmt. Ebenfalls von Bedeutung sind zytoskelettassoziierte Proteine wie Plectin oder Vinculin, welche die einzelnen Komponenten des Zytoskeletts miteinander verbinden, ihre Dynamiken regulieren und an der Ausbildung von Adhärenzstrukturen beteiligt sind. Bislang stehen in vielen biologischen Arbeiten Einzelzellen im Vordergrund. Da die kalziumabhängige Ausbildung von Adhäsionsstrukturen wie Desmosomen oder Adherens Junctions die mechanischen Eigenschaften von Zellen beeinflussen kann, standen in dieser Arbeit neben Einzelzellanalysen auch vergleichende Analysen von Zellschichten im Fokus. Hierbei wurden anhand von Elastizitätsmessungen mittels Rasterkraftmikroskopie die mechanischen Eigenschaften der Zellen analysiert und ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber externen Reizen durch Zugexperimente untersucht. Zusätzlich wurden Zellkraftanalysen sowie die Analyse bestimmter Proteine mittels Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Im Folgenden wird das Messergebnis als Mittelwert zusammen mit dem Vertrauensbereich für eine statistische Sicherheit von $P=95\%$ (CI_{95}) angegeben.

3.1 Zellkraft- und Zellelastizitätsmessungen an plectinreduzierten Zellen

3.1.1 Analyse der Zellkraft von plectinreduzierten Zellen

Den Großteil des Zytoskeletts in Keratinozyten bildet das Keratinnetzwerk. Seine Funktionen werden durch spezifische Anordnung der Keratinfilamente sowie ständige, dynamische Auf- und Abbauprozesse reguliert. Grundlage hierfür ist der Keratinzyklus, bei welchem Keratinfilamente peripher gebildet und während einer anhaltenden, zentripetalen Translokation in das bereits bestehende Keratinnetzwerk eingebaut werden. Ein aktinabhängiger retrograder Fluss könnte für diese Translokation verantwortlich sein [111]. Als Bindeglied zwischen Aktin und Keratin gilt Plectin, für welches bereits eine Aktin- und eine Keratinbindestelle identifiziert werden konnte [112]. Zusätzlich ist Plectin für die Verankerung von Keratinfilamenten in Hemidesmosomen und deren Stabilisierung von Bedeutung [29]

[113] [114] [115] [116].

Anhand von Vulva-Karzinomzellen, in welchen Plectin mittels shRNA auf 10-20% herunterreguliert wurde, ist der Einfluss der Aktin-Keratin-Verbindung auf die mechanischen Eigenschaften der Zellen untersucht worden. Die Herunterregulation von Plectin führt zu einer erhöhten Anzahl und Verlängerung der Stressfasern. Zudem ist das Keratinnetzwerk dieser Zellen weniger dicht und weist dickere Keratinfilamente sowie eine erhöhte Verzweigungslänge der Filamente auf [103]. Die hemidesmosomalen Strukturen sind in diesen Zellen deutlich reduziert [103].

Da Plectin sowohl in Hemidesmosomen als auch in Fokaladhäsionen vorkommt und das wichtigste Adapterprotein zwischen Aktin und Keratin darstellt, wurde der Einfluss der Plectin-Reduzierung auf die zellulären Kräfte untersucht. Hierfür wurden Zellkraftanalysen an Zellen, welche mit shRNA gegen Plectin (shPlectin-Zellen) transfiziert wurden und Zellen, welche mit funktionsloser RNA (shCtrl-Zellen) transfiziert wurden, durchgeführt.

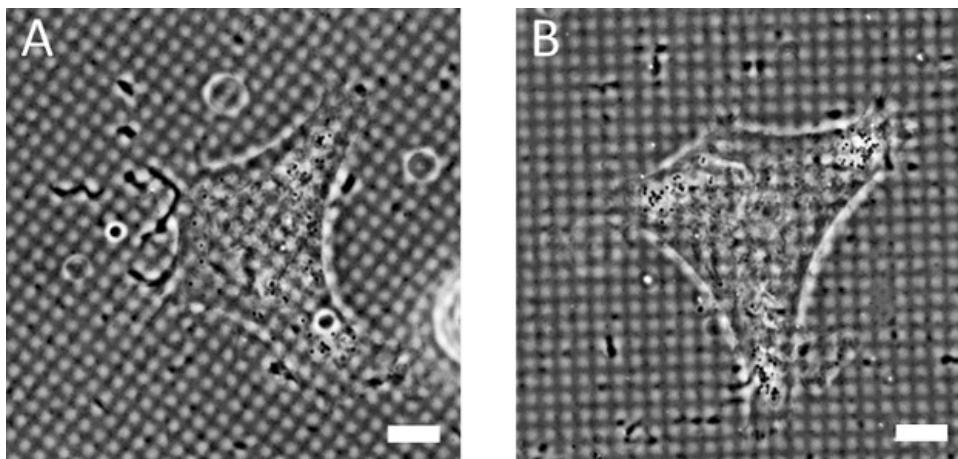


Abbildung 23: Phasenkontrastaufnahme von einer shCtrl-Zelle (A) und einer shPlectin-Zelle (B) auf mikrostrukturierten Substraten. Maßstab 10 μ m.

Die Zellen wurden hierfür auf elastische Substrate mit eingebetteten fluoreszierenden Mikrokugeln ausgesät und die zelluläre Substratdeformation anhand der Positionsverschiebung der Kugeln detektiert (siehe 2.8 auf Seite 61). 18 Stunden nach Aussaat waren die Zellen auf den fibronektinbeschichteten Oberflächen adhärirt. Zwischen den shPlectin- und den shCtrl-Zellen war morphologisch kein Unterschied erkennbar (siehe Abbildung 23). Aus den Substratdeformationen wurden die zellulären Kräfte bestimmt (siehe Abbil-

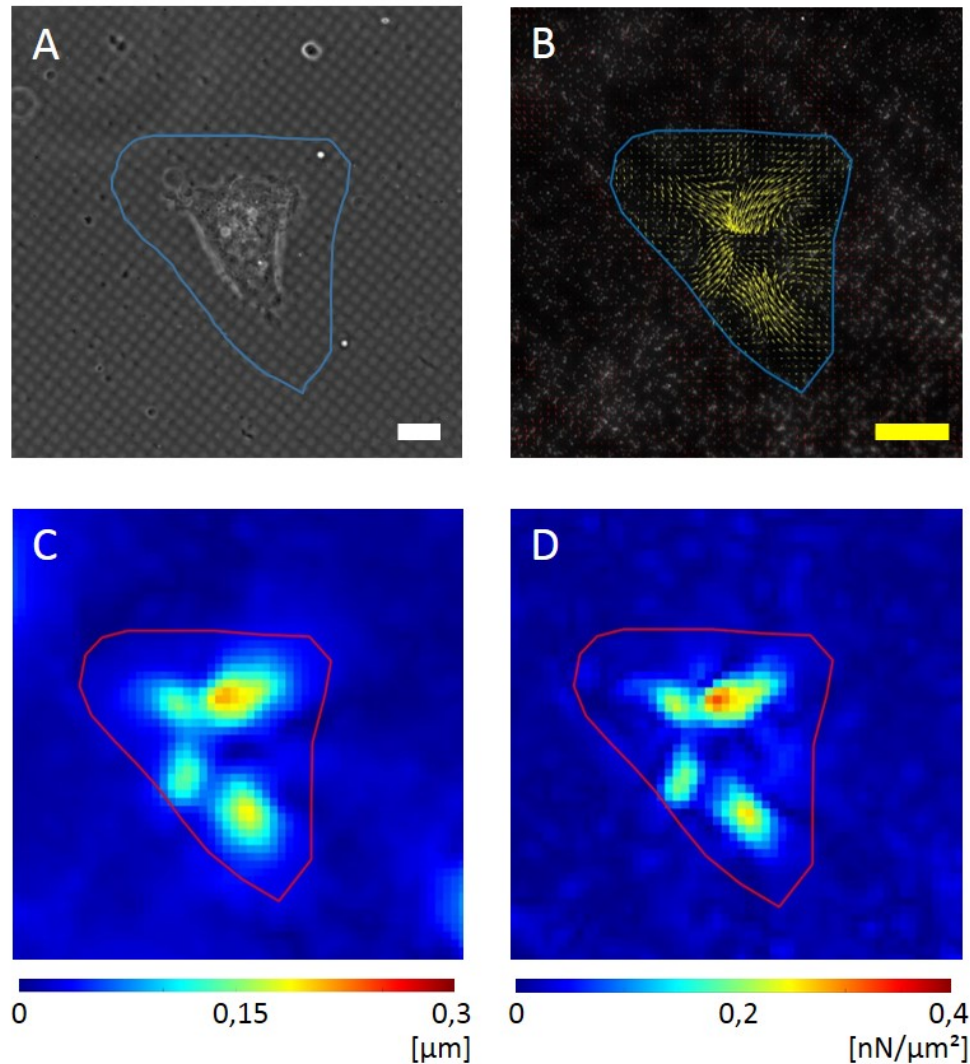


Abbildung 24: Zellkraftanalyse am Beispiel einer shCtrl-Zelle. (A) zeigt eine Phasenkontrastaufnahme der shCtrl-Zelle auf mikrostrukturiertem Substrat. Der blau umrandete Bereich markiert die Fläche, für welche die kontraktile Kräfte bestimmt wurde. Maßstab 10 μm . In (B) sind die Immunfluoreszenzaufnahme der fluoreszierenden Mikrokugeln im Substrat (weiß) sowie die aus der flächigen Kraftanalyse berechneten Kräfte (gelb) dargestellt. Maßstab 3 nN. (C) zeigt die Substratdeformation in μm , (D) die Beträge der Kräfte pro Einheitsfläche. Die Summe der kontraktile Kräfte für die dargestellte Zelle beträgt 124 nN.

dung 24). Die mittlere Summe aller kontraktilen Kräfte pro Zelle lag bei den shCtrl-Zellen bei 114 nN ($CI_{95} = 18$ nN) und bei den shPlectin-Zellen bei 103 nN ($CI_{95} = 13$ nN) und unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (siehe Abbildung 25).

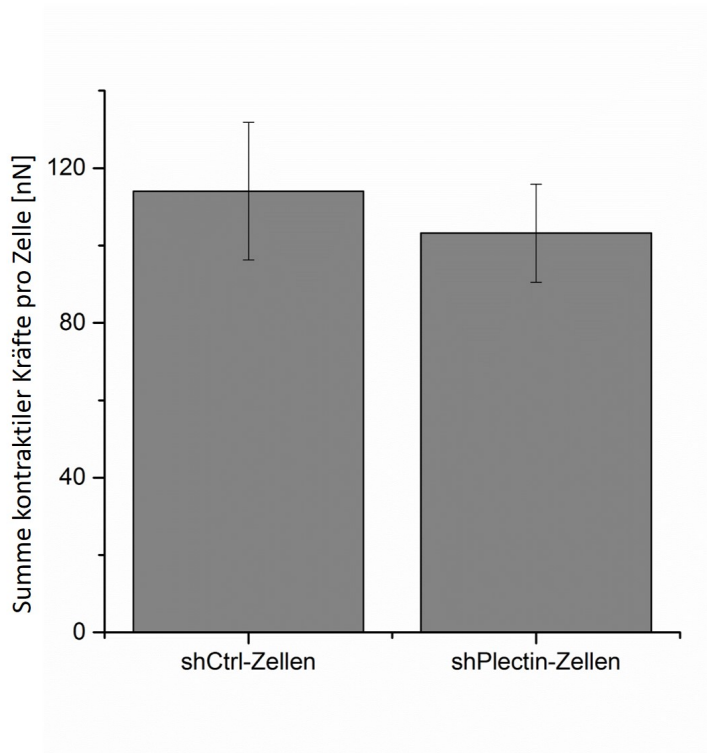


Abbildung 25: Summe aller kontraktilen Kräfte pro Zelle in den shCtrl- und shPlectin-Zellen. Die mittlere Summe der kontraktilen Kräfte liegt bei den shCtrl-Zellen bei 114 nN ($n = 86$) und bei den shPlectin-Zellen bei 103 nN ($n = 75$). Die Fehlerbalken geben den Vertrauensbereich für eine statistische Sicherheit von 95% an.

3.1.2 Analyse der Zellelastizität von plectinreduzierten Zellen

Da die erhöhte Keratinverzweigungslänge in shPlectin-Zellen Auswirkungen auf die Stabilität des Keratinnetzwerkes haben könnte, wurden die mechanischen Eigenschaften von shPlectin- und shCtrl-Zellen anhand von kraftspektroskopischen Messungen am Rasterkraftmikroskop untersucht (siehe 2.5.3.1 auf Seite 48). Für die Aufzeichnung der Kraftkurven wurde der Cantilever über dem Zellkern positioniert. An jeder Messposition wurden drei Kraft-Abstands-Kurven aufgezeichnet. Diese Kurven zeigten eine Überlagerung, wodurch eine permanente plastische Deformation und eine aktive Zellantwort während der Messung ausgeschlossen werden konnten (siehe Abbildung 26). Zudem konnte damit die Reproduzierbarkeit der Messung überprüft werden.

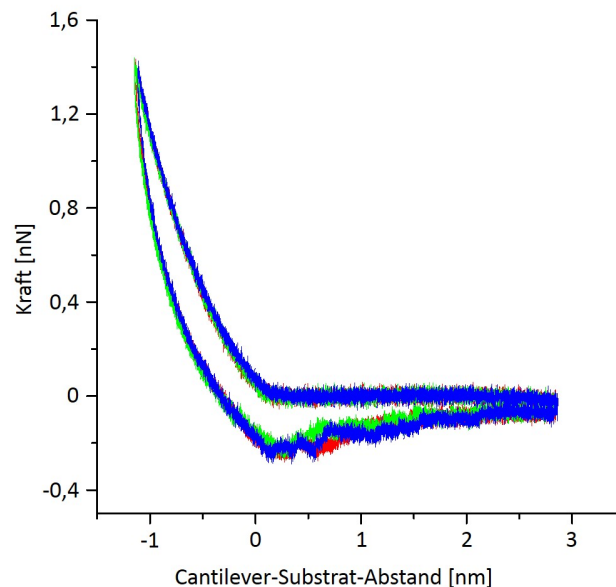


Abbildung 26: Überlagerung von drei Kraft-Abstands-Kurven. Die Kraftkurven wurden im Abstand von ca. 7 Sekunden an der gleichen Messposition oberhalb des Zellkerns aufgenommen. Die Annäherungskurven zeigen eine Überlagerung, bei den Rückzugskurven kommt es aufgrund von Adhäsionen zwischen Cantilever und Zelle zu leichten Abweichungen der Kurven.

Für die Bestimmung der Zellsteifigkeit aus den aufgezeichneten Kraft-Abstands-Kurven wurde der Kurvenbereich bis zu einer Indentationstiefe von 500 nm (nach dem Kontaktpunkt) berücksichtigt. Im ersten Schritt wurde durch Anpassung des allgemeinen Potenzgesetzes $F=A\delta^b$ an die Kraft-Abstands-Kurven der Mittelwert des Exponenten b

bestimmt (siehe Abbildung 27). Dieser lag für alle Zellen bei 1,8 ($CI_{95} = 0,1$) ($n = 55$). Zur Bestimmung der annähernden Steifigkeit ($A_{1,8}$) wurde der Exponent auf 1,8 festge-

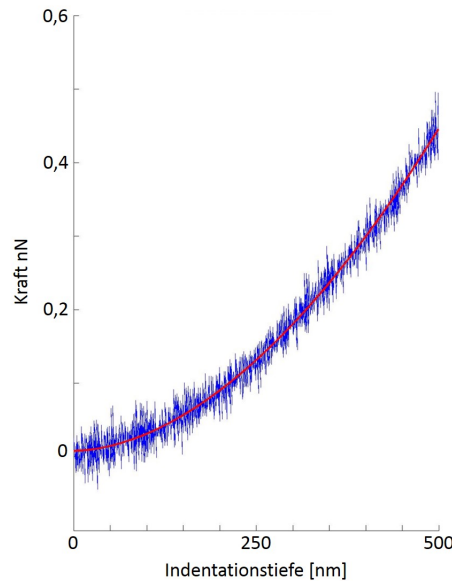


Abbildung 27: Anpassung eines allgemeinen Potenzgesetzes an die Kraftkurven zur Bestimmung des Exponenten b . In blau ist der Bereich von 0 - 500 nm nach dem Kontaktpunkt dargestellt. Die rote Linie zeigt die Anpassung des allgemeinen Potenzgesetzes an die Messkurve. Der aus dieser Kurve bestimmte Exponent beträgt 1,83.

setzt. Der Vorfaktor $A_{1,8}$, mittels welchem eine Aussage über die annähernde Steifigkeit der Zellen gemacht werden kann, lag für shCtrl-Zellen bei $111 \text{ N/m}^{1,8}$ ($CI_{95} = 15 \text{ N/m}^{1,8}$) und für shPlectin-Zellen bei $108 \text{ N/m}^{1,8}$ ($CI_{95} = 17 \text{ N/m}^{1,8}$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellelastizitäten der zwei Zelltypen konnte hierbei nicht festgestellt werden (siehe Abbildung 28).

Zusätzlich wurde die Kraft, welche notwendig ist, um eine bestimmte Indentationstiefe zu erreichen, aus den Rohdaten der Rasterkraftmikroskop-Messungen ermittelt und in einem Kraft-Indentations-Diagramm dargestellt. Ohne die Verwendung eines (möglicherweise artefaktbehafteten) Modells konnten so Rückschlüsse auf die Elastizität gezogen werden. In steiferen Bereichen ist eine höhere Kraft für das Erreichen einer bestimmten Indentations-tiefe notwendig als in weicheren Bereichen. Die Überlagerung der Kurven für die shCtrl- und shPlectin-Zellen verdeutlichte die vergleichbare Elastizität der beiden Zelltypen. Die notwendige Kraft, um eine Indentation von 500 nm zu erreichen, lag bei den Kontrollzellen bei 0,50 nN ($CI_{95} = 0,07 \text{ nN}$), bei den shPlectin-Zellen bei 0,50 nN ($CI_{95} = 0,07 \text{ nN}$) und zeigte keinen signifikanten Unterschied der beiden Zelltypen (siehe Abbildung 29).

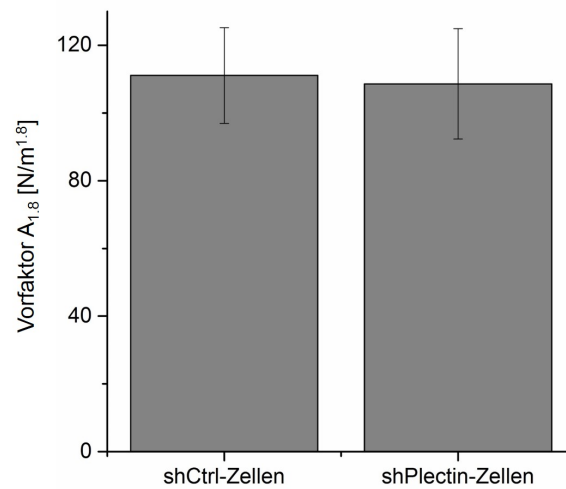


Abbildung 28: Annähernde Steifigkeit von shCtrl- und shPlectin-Zellen. Der Vorfaktor $A_{1,8}$ beschreibt die annähernde Zellsteifigkeit und liegt für shCtrl-Zellen bei $111 \text{ N/m}^{1,8}$ ($n = 26$) und für shPlectin-Zellen bei $108 \text{ N/m}^{1,8}$ ($n = 33$). Die Fehlerbalken geben den Vertrauensbereich für eine statistische Sicherheit von 95% an.

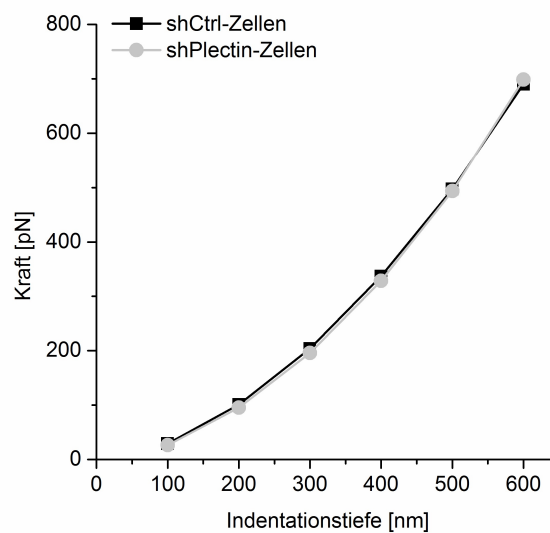


Abbildung 29: Kraft-Indentationstiefen-Diagramm für shCtrl- und shPlectin-Zellen. Die Überlagerung der beiden Mittelwertkurven zeigt, dass für shCtrl- und shPlectin-Zellen vergleichbare Kräfte aufgewendet werden müssen, um Indentationstiefen zwischen 100 und 600 nm zu erreichen ($n=26$).

3.2 Einfluss veränderter Keratinnetzwerke auf die Desmosomenlokalisation und die mechanischen Eigenschaften von Zellen

Obwohl die, durch Reduzierung des Proteins Plectin hervorgerufenen, Veränderungen des Keratinnetzwerkes nicht zu signifikanten Auswirkungen auf die mechanischen Eigenschaften dieser Zellen führten, haben direkte Veränderungen im Protein Keratin oft einen drastischen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften von Zellen. Beispielhaft hierfür ist die Krankheit Epidermolysis bullosa simplex (EBS), welche mit einer erhöhten Fragilität und Stresssensitivität der Haut einhergeht. Der genaue Mechanismus dieser Krankheit ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass sie durch Mutationen im Keratin 14 ausgelöst werden kann [96].

Durch Zellkraftanalysen und kraftspektroskopische Messungen an KTyI/-K14R131P-Zellen (siehe 2.2.1) wurden die Auswirkungen dieser Mutation auf das Keratinnetzwerk sowie die mechanischen Eigenschaften dieser Zellen detailliert untersucht. Anhand von immunzytochemischen Färbungen sowie kraftspektroskopischen Rasterkraftmikroskop-Messungen wurden vergleichende Untersuchungen der Zelleigenschaften zwischen KTyI -/-, KTyI/-K14, KTyI/-K14R131P und KTyIWT durchgeführt.

Fluoreszenzaufnahmen des Keratins 14 zeigen sowohl in KTyIWT- als auch in KTyI/-K14 -Zellen ein dichtes, den Zellkern umspannendes Keratinnetzwerk mit vergleichbarer Maschenweite und Filamentdicke. In KTyI/- -Zellen ist kein Keratinsignal erkennbar, da die Deletion des sauren TypI-Keratinclusters aufgrund fehlender Bindungspartner zur Degradation der basischen Keratine in diesen Zellen führt. Die Expression von mutiertem Keratin 14 in KTyI/-K14R131P-Zellen führt zur Bildung von ringförmigen Keratinaggregaten im Zytoplasma dieser Zellen (vergleiche Abbildung 30). Die Ausbildung eines Keratinnetzwerkes konnte in diesen Zellen nicht beobachtet werden. Das Mikrotubuli- und Aktinnetzwerk ist in KTyIWT-, KTyI/- - und KTyI/-K14- Zellen vergleichbar und ist auch in KTyI/-K14R131P-Zellen trotz des dominant-negativen Effektes dieser Mutation unbeeinflusst [117].

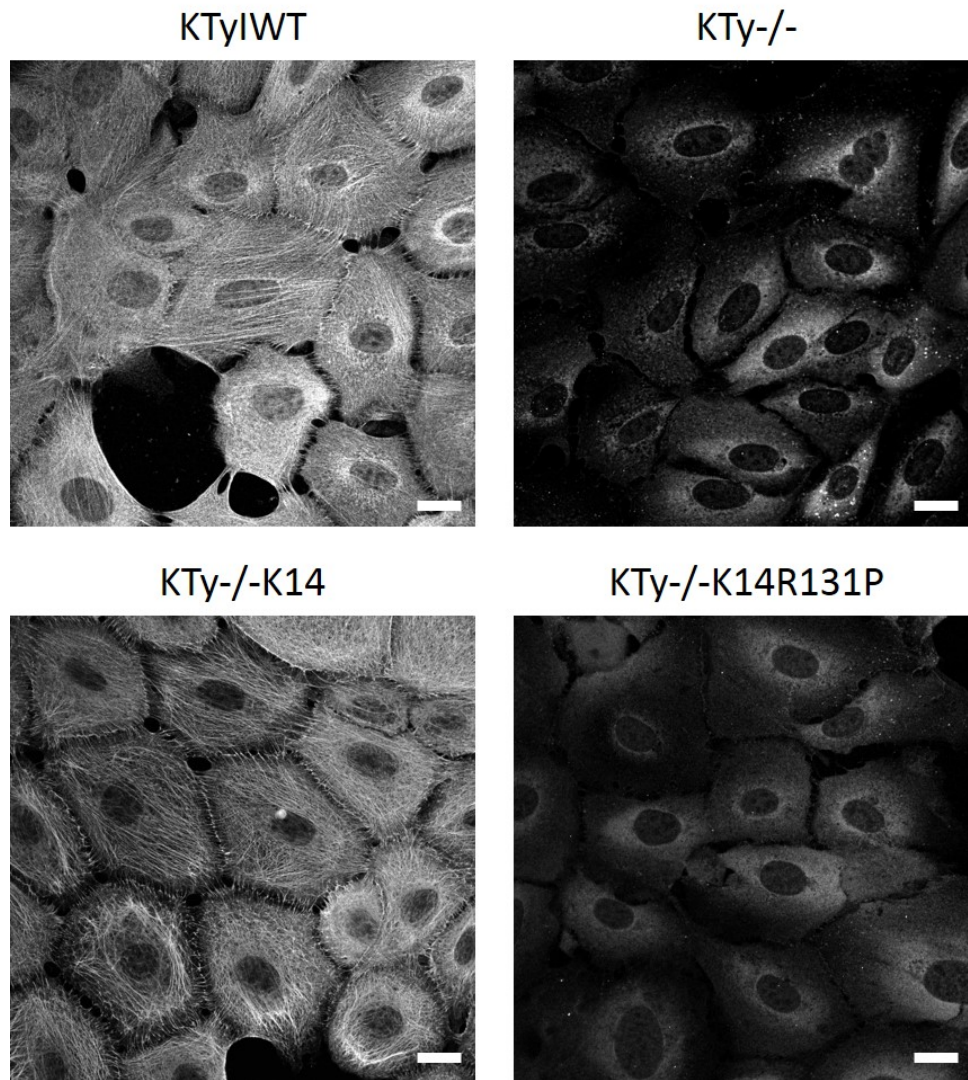


Abbildung 30: Immunfluoreszenzaufnahmen des Keratinnetzwerkes. Die Aufnahmen zeigen ein dichtes, die Zelle durchspannendes Keratinnetzwerk in KTyIWT- und KTyI-/-K14-Zellen, während in KTyI-/- -Zellen kein spezifisches Keratinsignal erkennbar ist. In KTyI-/-K14R131P-Zellen ist ein schwaches Keratinsignal und ebenfalls kein Keratinnetzwerk erkennbar. Maßstab 20 μm .

3.2.1 Modifikation der Desmosomenlokalisierung durch K14R131P-Mutation

Die Mutation K14R131P befindet sich im Helix-Initiierungsmotiv der Keratinfilamente und führt deshalb in keratinfreien Keratinozyten, welche neben den basischen Keratinen lediglich das mutierte K14 exprimieren, zur Bildung von Keratinaggregaten im Zytoplasma. Neben einem modifizierten Keratinnetzwerk wurde in diesen Zellen auch eine veränderte Lokalisation der Desmosomen beobachtet.

Der Einfluss des veränderten Keratinnetzwerkes auf die Lokalisation der Desmosomen wurde anhand des desmosomalen Proteins Desmoplakin in dieser Arbeit immunzytochemisch näher untersucht und statistisch ausgewertet (siehe 2.6.5 auf Seite 54). Während desmoplakinreiche Strukturen in KTyIWT- und KTyI/-K14- Zellen zahlreich entlang der Zellmembran positioniert waren, wiesen KTyI/- -Zellen eine veränderte Desmoplakin-Lokalisation auf. In diesen Zellen war neben einem membranständigen auch ein zytoplasmatisches Desmoplakin-Signal erkennbar (siehe Abbildung 31). Die Expression von K14R131P führte zu einer Reduzierung desmosomalen Strukturen entlang der Zellmembran. Die Menge an Desmoplakin entlang der Zellgrenzen war in diesen Zellen geringer als in KTyI/- Zellen. Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten eine veränderte Lokalisierung von Desmoplakin, welche mit der Menge an zytoplasmatischen Keratinaggregaten im Zusammenhang steht.

Zur detaillierteren Auswertung wurden Korrelationsanalysen für die Menge an K14-Aggregaten und membranständigem Desmoplakinsignal durchgeführt. Für die Auswertung wurden die Zellgrenzen in den Immunfluoreszenzaufnahmen manuell markiert. Anschließend wurden die Zellen entsprechend der Menge ihrer Keratinaggregate in Zellen mit wenigen bzw. Zellen mit vielen Aggregaten eingeteilt (siehe hierzu 2.6.5 auf Seite 54). Hierbei zeigte sich, dass eine geringe Anzahl von zytoplasmatischen Keratinaggregaten, mit einem Bedeckungsgrad von weniger als vier Prozent der Zellfläche zu einer Lokalisation des Desmoplakinsignals entlang der Zellmembran führte, während eine hohe Anzahl an Keratinaggregaten mit einem Bedeckungsgrad von mehr als vier Prozent der Zellfläche zu einer signifikant niedrigeren Lokalisation von desmosomalen Strukturen in der Zellmembran und zu einer erhöhten Lokalisation dieser Strukturen im Zytoplasma führte.

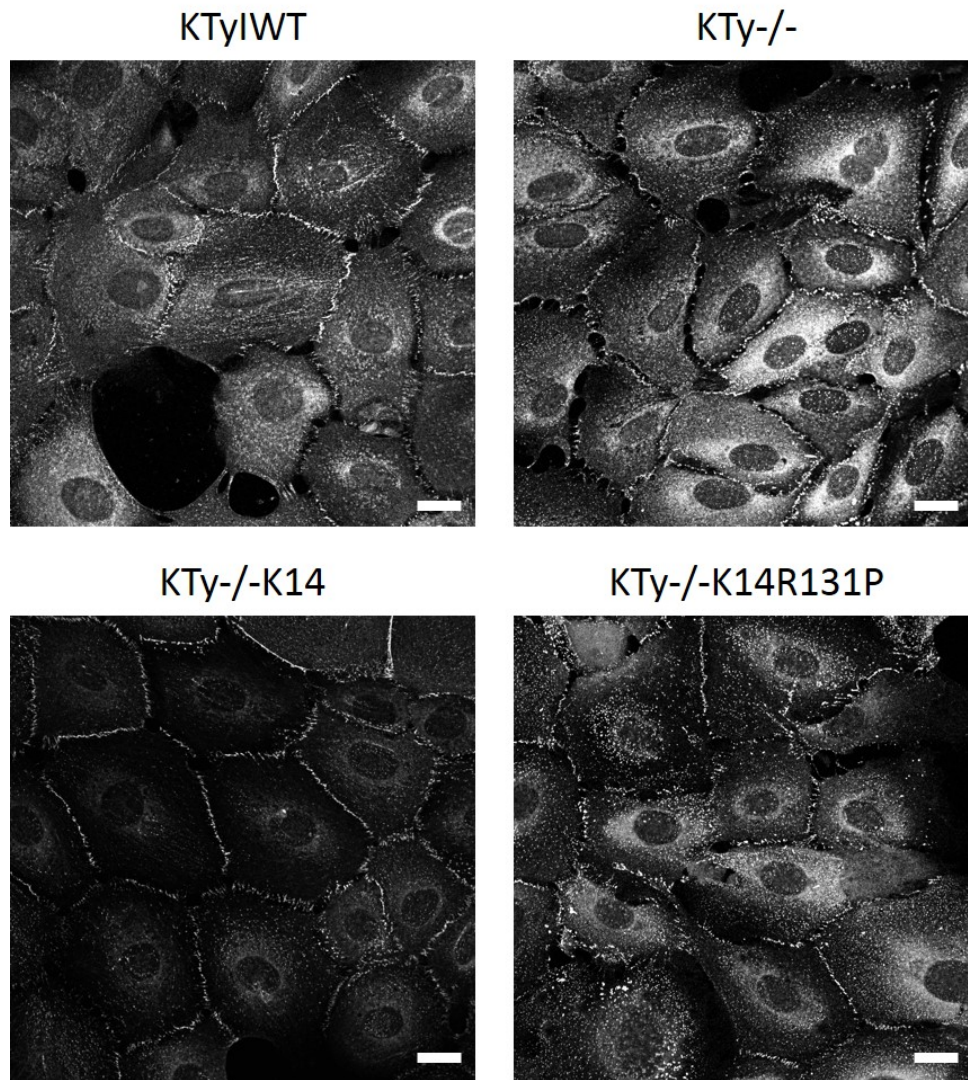


Abbildung 31: Immunfluoreszenzaufnahmen desmosomaler Strukturen. Desmosomale Strukturen wurden anhand des Proteins Desmoplakin immunzytochemisch markiert. Das Desmoplakinsignal ist in KTyIWT- und KTyI-/-K14-Zellen entlang der Zellmembran lokalisiert, während in KTyI-/- - und KTyI-/-K14R131P-Zellen ein vermindertes membranständiges Signal und ein erhöhtes zytoplasmatisches Signal erkennbar sind. Maßstab 20 μm .

Der Bedeckungsgrad der Zellgrenzen mit desmosomalen Strukturen (siehe 2.6.5 auf Seite 54) wies mit 16% zwischen Zellen mit wenigen Keratinaggregaten den höchsten Wert auf. Dieser Bedeckungsgrad unterscheidet sich signifikant von dem der Zellgrenzen zwischen zwei Zellen mit vielen Aggregaten, welcher bei 14% lag. Der Bedeckungsgrad der Zellgrenzen von Zellen mit vielen Keratinaggregaten war hierbei folglich um 12% geringer als der von Zellen mit wenigen Aggregaten. An Zellgrenzen zwischen einer Zelle mit vielen und einer mit wenigen Aggregaten kam es zu einem intermediären Effekt, wobei der Bedeckungsgrad dieser Zellgrenzen bei 15% lag und signifikant niedriger war als der Bedeckungsgrad der Zellgrenzen zwischen Zellen mit wenigen Aggregaten. Vom Bedeckungsgrad der Zellgrenzen zwischen Zellen mit vielen Keratinaagregaten unterschied er sich nicht signifikant (siehe Abbildung 32).

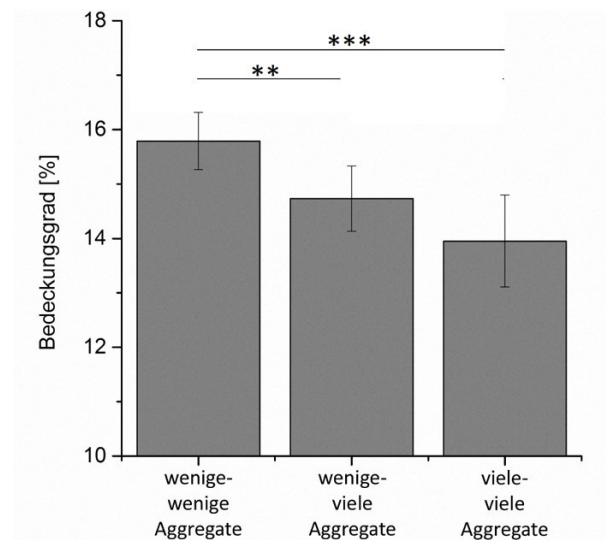


Abbildung 32: Bedeckungsgrad der Zellgrenzen mit desmosomalen Strukturen. Die Zellgrenzen der KTyI/-K14R131P-Zellen wurden entsprechend des Bedeckungsgrades der Zellen mit Keratinaggregaten in Zellgrenzen zwischen Zellen mit wenigen Aggregaten ($n = 205$), mit vielen Aggregaten ($n = 108$) und in Zellgrenzen zwischen einer Zelle mit wenigen und einer Zelle mit vielen Aggregaten eingeteilt ($n = 210$). Die Fehlerbalken geben den Vertrauensbereich für eine statistische Sicherheit von 95% an.

3.2.2 Einfluss der K14R131P-Mutation auf die Zellelastizität

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion des Keratin-TypII-Genclusters und die damit einhergehende Abwesenheit eines Keratinnetzwerkes zu einer verminderten Steifigkeit von Keratinozyten führen [106]. Immunfluoreszenzaufnahmen von KTyIK14R131P-Zellen zeigen, dass diese EBS-assoziierte Mutation zur Ausbildung von Keratinaggregaten führt und den Aufbau eines Keratinnetzwerkes verhindert. Dies deutet darauf hin, dass auch diese Zellen im Vergleich zu Kontroll-Keratinozyten veränderte mechanische Eigenschaften und eine veränderte Elastizität aufweisen könnten.

Um den Einfluss der EBS-auslösenden Mutation auf die mechanischen Eigenschaften der Zellen zu untersuchen, wurden kraftspektroskopische Rasterkraftmikroskop-Messungen an einzeln liegenden Zellen oberhalb des Zellkerns durchgeführt. Die annähernde Steifigkeit (A) wurde durch Anpassung des allgemeinen Potenzgesetzes $F=A\delta^b$ an die aufgezeichneten Kraft-Abstands-Kurven bestimmt. Der Mittelwert des Exponenten b lag für die Kurven aller Zelltypen bei 2,0 ($CI_{95} = 0,4$) ($n = 77$) und wurde für die Berechnung von A auf den Wert 2 festgelegt (siehe Abbildung 33).

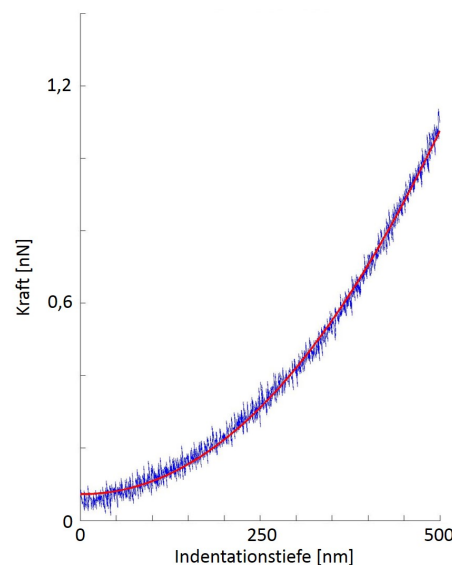


Abbildung 33: Anpassung eines allgemeinen Potenzgesetzes an die Kraftkurven von Kontroll-Keratinozyten zur Bestimmung des Exponenten b . In blau ist der Bereich von 0 - 500 nm nach dem Kontaktpunkt dargestellt. Die rote Linie zeigt die Anpassung des allgemeinen Potenzgesetzes an die Messkurve. Der aus dieser Kurve bestimmte Exponent beträgt 2,07.

Als einziger freier Parameter wurde anschließend der Vorfaktor A_2 bestimmt. Dieser lag bei Einzelzellmessungen an Kontroll-Keratinocyten bei 1.000 N/m^2 ($CI_{95} = 200 \text{ N/m}^2$) und für KTyI-/- Zellen bei 650 N/m^2 ($CI_{95} = 100 \text{ N/m}^2$). Die KTyI-/- Zellen erreichen 65% der Steifigkeit von Kontrollzellen und sind signifikant weicher als diese. Die Expression von K14 in KTyI-/-K14-Zellen führte zu einer annähernden Steifigkeit von 1.000 N/m^2 ($CI_{95} = 290 \text{ N/m}^2$) und somit zu einer vergleichbaren annähernden Steifigkeit der Kontrollzellen. Die Steifigkeit dieser Zellen unterscheidet sich nicht signifikant von der der KTyIWT-Zellen, ist jedoch signifikant höher im Vergleich zu KTyI-/- Zellen. In KTyI-/-K14R131P-Zellen führte die Expression des mutierten Keratin 14 zu einer annähernden Steifigkeit von 512 N/m^2 ($CI_{95} = 96 \text{ N/m}^2$). Diese Zellen erreichten damit nur 51% der Steifigkeit von Kontrollzellen und sind signifikant weicher als KTyIWT- und KTyI-/-K14-Zellen. Die Zellsteifigkeit von KTyI-/-K14R131P-Zellen unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der Steifigkeit von KTyI-/- Zellen (siehe Abbildung 34). Die K14R131P Mutation führt somit augenscheinlich zu einer etwas stärkeren Reduktion der Zellsteifigkeit als die vollständige Abwesenheit von Keratinfilamenten in KTyI-/-Zellen. Verglichen mit diesen Zellen weisen die KTyI-/-K14R131P-Zellen eine um 21% reduzierte Zellelastizität auf.

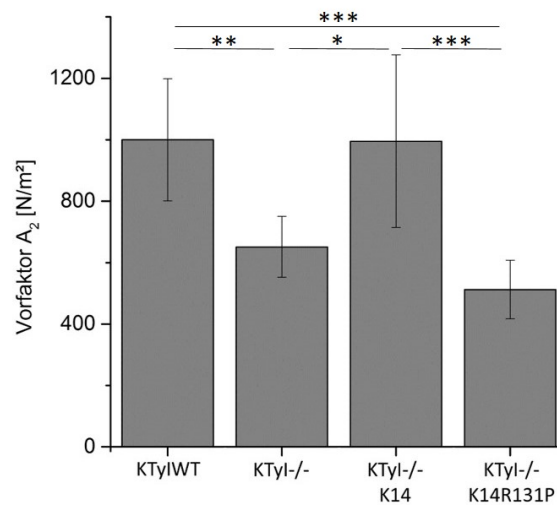


Abbildung 34: Annähernde Zellsteifigkeit von Keratinocyten. Die annähernde Steifigkeit beträgt für KTyIWT-Zellen 1.000 N/m^2 ($CI_{95} = 200 \text{ N/m}^2$) ($n = 31$), für KTyI-/-Zellen 650 N/m^2 ($CI_{95} = 100 \text{ N/m}^2$) ($n = 33$), für KTyI-/-K14-Zellen 1.000 N/m^2 ($CI_{95} = 290 \text{ N/m}^2$) ($n = 40$) und für KTyI-/-K14R131P-Zellen 512 N/m^2 ($CI_{95} = 96 \text{ N/m}^2$) ($n = 33$). Fehlerbalken geben den Vertrauensbereich für eine statistische Sicherheit von 95% an.

Die Analyse der notwendigen Kräfte zur Erreichung bestimmter Indentationstiefen aus den Rohdaten der Rasterkraftmikroskop-Messungen bestätigen diese Ergebnisse (siehe

Abbildung 35). Auch hier erzielten die KTyI/-K14-Zellen Werte, welche mit denen der KTyIWT-Zellen vergleichbar waren. Diese lagen bei einer Indentationstiefe von 500 nm für KTyIWT-Zellen bei 247 pN ($CI_{95} = 52$ pN) und für KTyI/-K14-Zellen bei 218 pN ($CI_{95} = 45$ pN). Die Kräfte, welche bei KTyI/- - und KTyI/-K14R131P-Zellen notwendig waren, um eine Indentation von 500 nm zu erreichen, waren signifikant geringer als die Kräfte für KTyIWT- und KTyI/-K14-Zellen. Für KTyI/- -Zellen lag die Kraft, welche aufgewendet werden musste, bei 158 pN ($CI_{95} = 23$ pN) und für KTyI/-K14R131P-Zellen bei 121 pN ($CI_{95} = 22$ pN) (siehe Abbildung 35).

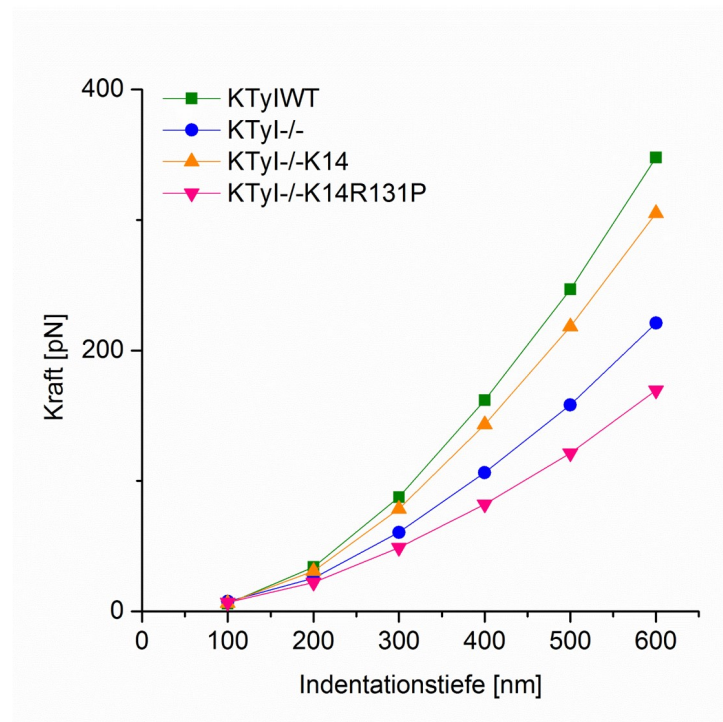


Abbildung 35: Kraft-Indentationstiefen-Diagramm von Keratinozyten. Die Darstellung der Kurven verdeutlicht, dass für Indentationen zwischen 250 nm und 600 nm für KTyIWT-Zellen die höchsten Kräfte aufgewendet werden müssen, gefolgt von KTyI/-K14- und KTyI/-Zellen, während für KTyI/-K14R131P die geringsten Kräfte notwendig sind ($n =$ siehe 34).

Da gezeigt werden konnte, dass die K14R131P-Mutation nicht nur Auswirkungen auf das Keratinnetzwerk sondern auch auf die Lokalisation von Desmosomen hat, wurden zusätzliche kraftspektroskopische Messungen an Zellschichten unter Kalziumeinfluss durchgeführt. Diese sollten den Einfluss der veränderten Desmosomenlokalisation auf die Steifigkeit der Zellen sowie mögliche Unterschiede im Vergleich zu Einzelzellmessungen aufzeigen. Die Messungen wurden wie zuvor beschrieben oberhalb des Zellkerns durch-

geführt und anschließend mit einem institutseigenen Algorithmus ausgewertet.

Die KTyIWT-Zellschichten unter Kalziuminkubation erreichten eine annähernde Steifigkeit von 2.550 N/m^2 ($CI_{95} = 450 \text{ N/m}^2$), die KTyI/- -Zellschichten eine Steifigkeit von 1.160 N/m^2 ($CI_{95} = 250 \text{ N/m}^2$). Damit erreichten die KTyI/- -Zellschichten lediglich 46,4% der Steifigkeit von Kontrollzellen und waren signifikant elastischer als diese. Die Expression von K14 in KTyI/-K14-Zellschichten führte zu einer annähernden Steifigkeit von 1.660 N/m^2 ($CI_{95} = 280 \text{ N/m}^2$), womit durch die Expression eines einzelnen sauren Keratins 66,4% der Steifigkeit von Kontrollzellen wiederhergestellt werden konnten. Im Vergleich zu Einzelzellen, bei welchen die Expression von Keratin 14 zur Wiederherstellung der annähernden Steifigkeit von Kontrollzellen führte, unterscheidet sich die Elastizität zwischen KTyIWT- und KTyI/-K14-Zellschichten signifikant. Die Expression des mutierten K14R131P in KTyI/-K14R131P-Zellen führte zu einer annähernden Steifigkeit von 1.150 N/m^2 ($CI_{95} = 250 \text{ N/m}^2$) und erreichte damit nur 46% der Zellsteifigkeit der KTyIWT-Zellschichten (siehe Abbildung 36). Die KTyI/-K14R131P-Zellschichten wiesen damit, wie bereits bei den Einzelzellen, die geringste Steifigkeit auf.

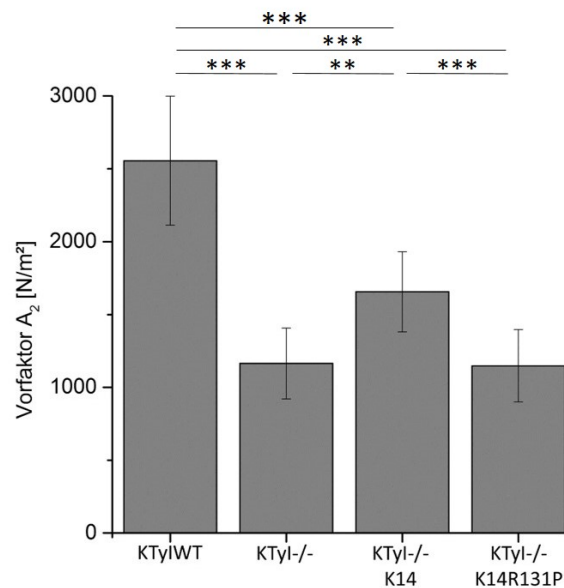


Abbildung 36: Annähernde Zellsteifigkeit von Keratinozyten unter Kalziumeinfluss.

Die annähernde Steifigkeit der Zellen wurde mittels kraftspektroskopischer Messungen oberhalb des Zellkerns bestimmt. Sie beträgt für KTyIWT-Zellen 2500 N/m^2 ($n = 47$), für KTyI/- -Zellen 1160 N/m^2 ($n = 47$), für KTyI/-K14-Zellen 1660 N/m^2 ($n = 44$) und für KTyI/-K14R131P-Zellen 1150 N/m^2 ($n = 45$). Die Fehlerbalken geben den Vertrauensbereich für eine statistische Sicherheit von 95% an.

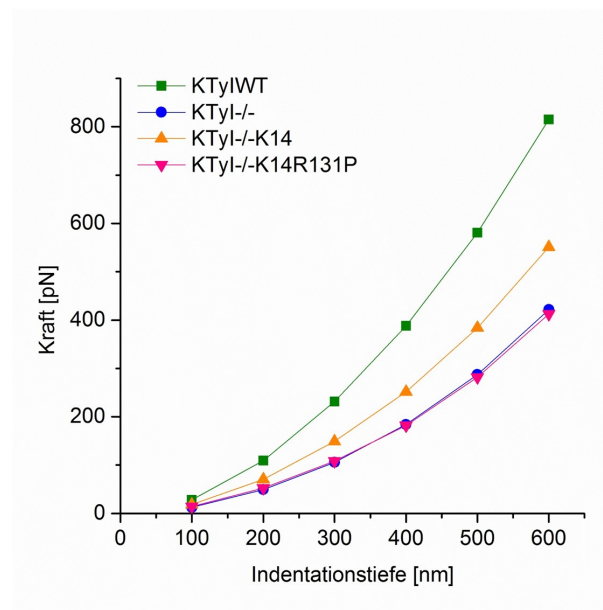


Abbildung 37: Kraft-Indentationstiefen-Diagramm von Keratinozyten unter Kalziueinfluss. Die Überlagerung der Mittelwertkurven für KTyI-/- -Zellen und KTyI-/-K14R131P-Zellen unter Kalziueinfluss zeigt, dass für eine Indentation von 100 bis 600 nm bei diesen Zellen eine vergleichbare Kraft notwendig ist. Die Kräfte für Indentationen in KTyI-/-K14 und KTyIWT-Zellen hingegen liegen deutlich über diesen Kräften ($n > 31$).

Die Inkubation der Zellen in Zellkulturmedium mit einer Kalziumkonzentration von 1,2 mM, welches die Ausbildung von Adhärenzverbindungen ermöglicht, führte bei allen Zelltypen zu einer deutlichen Erhöhung des Vorfaktors A_2 . Auffällig hierbei war, dass die Steifigkeiten nicht in allen Zelltypen gleichermaßen anstiegen. Bei KTyIWT-Zellen war ein Anstieg des Vorfaktors A_2 von 150% zu verzeichnen, bei KTyI-/- -Zellen um 78% und bei KTyI-/-K14- und KTyI-/-K14R131P-Zellen um 66% bzw. 125%. So reichte die Expression des sauren Keratins 14 in Einzelzellen aus, um in KTyI-/- -Einzelzellen die annähernde Steifigkeit von KTyIWT-Zellen wiederherzustellen, während es in Zellschichten unter Kalziuminkubation lediglich 66% der Steifigkeit waren (siehe Abbildung 37). Die Kraft, welche für eine Indentation von 500 nm notwendig war, unterschied sich signifikant zwischen KTyI-/- - und KTyI-/-K14R131P-Einzelzellen, während in Zellschichten zwischen diesen Zellen kein signifikanter Unterschied erkennbar war (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Übersicht der Zellelastizitäten von Keratinozyten in Ab- und Anwesenheit von Kalzium

Zelltyp	Vorfaktor A_2 [N/m ²]	Kraft für 500 nm Indentation [pN]
KTyIWT (0 h Ca ²⁺)	1000 N/m ² (CI ₉₅ = 200 N/m ²)	247 pN (CI ₉₅ = 52 pN)
KTyIWT (24 h Ca ²⁺)	2550 N/m ² (CI ₉₅ = 450 N/m ²)	580 pN (CI ₉₅ = 95 pN)
KTyI/- (0 h Ca ²⁺)	650 N/m ² (CI ₉₅ = 100 N/m ²)	158 pN (CI ₉₅ = 23 N/m ²)
KTyI/- (24 h Ca ²⁺)	1160 N/m ² (CI ₉₅ = 250 N/m ²)	290 pN (CI ₉₅ = 61 pN)
KTyI/-K14 (0 h Ca ²⁺)	1000 N/m ² (CI ₉₅ = 290 N/m ²)	218 pN (CI ₉₅ = 45 pN)
KTyI/-K14 (24 h Ca ²⁺)	1660 N/m ² (CI ₉₅ = 280 N/m ²)	390 pN (CI ₉₅ = 55 pN)
KTyI/-K14R131P (0 h Ca ²⁺)	512 N/m ² (CI ₉₅ = 96 N/m ²)	121 pN (CI ₉₅ = 22 pN)
KTyI/-K14R131P (24 h Ca ²⁺)	1150 N/m ² (CI ₉₅ = 250 N/m ²)	280 pN (CI ₉₅ = 60 pN)

3.2.3 Vergleich der Integrität von Zellschichten mit veränderten Keratinnetzwerken

Kraftspektroskopische Messungen haben gezeigt, dass veränderte Keratinnetzwerke der KTyI/- -, KTyI/-K14-, KTyI/-K14R131P- Zellen einen starken Einfluss auf die mecha-

nischen Eigenschaften dieser Zellen haben und bezüglich der Zellelastizität zu deutlichen Unterschieden im Vergleich zur Steifigkeit von KTyIWT-Zellen führen. Diese Differenzen werden durch die Inkubation mit Kalzium noch verstärkt, wodurch sich die Zellelastizität in konfluenten Zellschichten für alle Zelltypen signifikant von der Elastizität der KTyIWT-Zellen unterscheidet. Da die Kalziuminkubation zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten führt, sind diese augenscheinlich für die veränderten mechanischen Eigenschaften der Zellen von Bedeutung. Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen konnte bereits gezeigt werden, dass die Veränderung des Keratinnetzwerkes in KTyIK14R131P-Zellen auch Auswirkung auf die Lokalisation der Desmosomen hat. Mit Hilfe von Dehnungsexperimenten wurden die Auswirkungen der veränderten Desmosomenlokalisation sowie der modifizierten mechanischen Eigenschaften der Zellen in Bezug auf die Integrität der Zellschicht näher untersucht.

Hierfür wurden die Zellen auf elastische Zugkammern ausgesät und zur Ausbildung von desmosomalen Verbindungen für 24 Stunden in Medium mit 1,2 mM Kalzium inkubiert. Anschließend wurden sie für 90 Minuten mit einer Frequenz von 4 Hz und einer Amplitude von 14% zyklisch bzw. einmalig um 40% gedehnt. Nach 90 Minuten Dehnung mit einer Amplitude von 14% zeigten alle Zellen ein senkrecht zur Zugrichtung orientiertes Aktinnetzwerk. Das Keratinnetzwerk war unverändert und zeigte keine Vorzugsorientierung (siehe Abbildung 38). Die Zellmembranen benachbarter Zellen lagen auch nach 90-minütiger, zyklischer Dehnung nah beieinander und wiesen Kontaktstellen auf. Die Aktinfilamente benachbarter Zellen wiesen eine ähnliche Orientierung auf, was auch nach 90-minütiger Dehnung auf vorhandene Zell-Zell-Kontakte in allen Zelltypen schließen lässt. Phasenkontrastaufnahmen der KTyIWT- und KTyI-/K14R131P-Zellen zeigten, dass die Zellmembranen benachbarter Zellen auch nach einmaliger Dehnung um 40% nahe beieinander lagen und keine Rissbildung oder ein vergrößerter Abstand zwischen den Zellen zu erkennen war (siehe Abbildung 39).

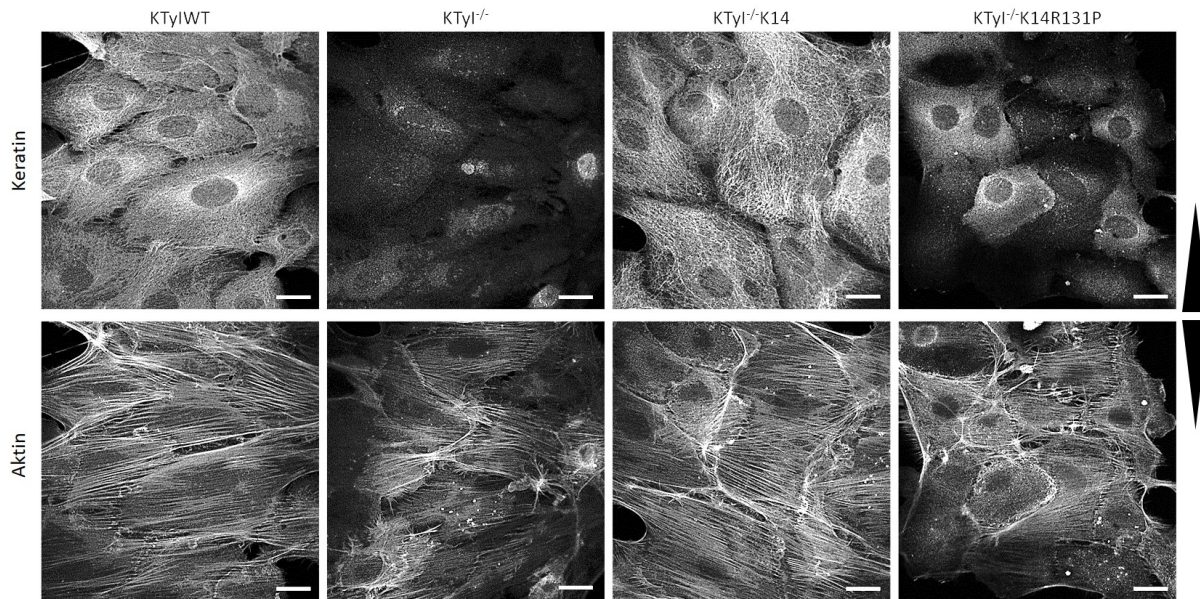


Abbildung 38: Immunfluoreszenzaufnahmen des Keratin- und Aktinnetzwerkes nach zyklischer Dehnung. Das Keratinnetzwerk von KTyIWT- und KTyIK14-Zellen ist nach 90 Minuten zyklischer Dehnung (4Hz, 14%) augenscheinlich unverändert und bildet ein dichtes, den Zellkern umspannendes Netzwerk. Die Pfeile geben die Zugrichtung an. Maßstab 10 µm.

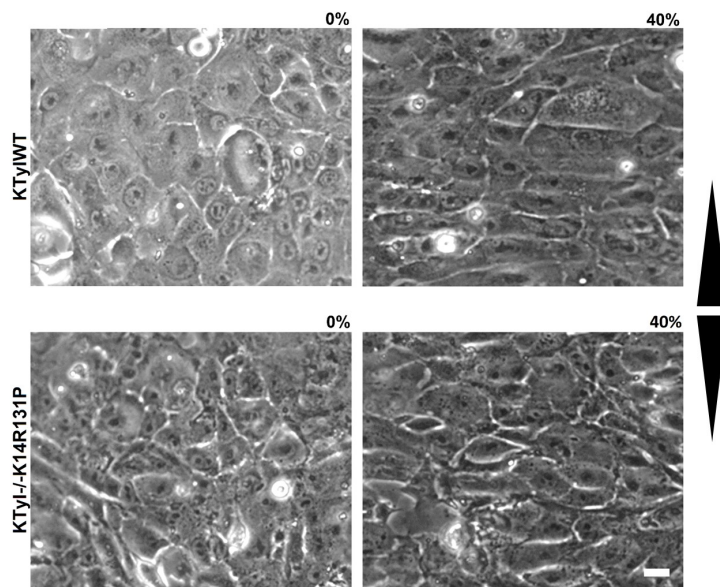


Abbildung 39: Phasenkontrastaufnahmen von Keratinozyten bei 40% Dehnung. Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen aufgespannte, adhärente KTyIWT- und KTyI-/-K14R131P-Zellen auf elastischen Zugkammern. Auch bei 40% Dehnung ist in beiden Zelltypen keine Rissbildung erkennbar. Maßstab 20 µm.

3.3 Analyse der Adhäsionsstrukturen und der Zytoskelettorganisation unter dem Einfluss von Kalzium und zyklischer Dehnung

Es wurde gezeigt, dass selbst keratinfreie sowie KTyI-/-K14R131P Keratinozyten hochfrequente, zyklische Dehnungen unbeschadet überstehen. Neben dem Keratinnetzwerk und den keratinassoziierten Adhäsionsverbindungen sind auch das Aktinnetzwerk und die damit assoziierten Verbindungen für den Zusammenhalt von Zellschichten und die Widerstandsfähigkeit gegen mechanische Reize von großer Bedeutung. Um den Einfluss der kalziumabhängigen, aktinassoziierten Adhärenzverbindungen auf die Reorientierung des Aktinnetzwerkes unter zyklischer Dehnung näher zu untersuchen, wurden Zugexperimente an Keratinozyten mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen durchgeführt. Hierbei handelte es sich um vinculinfreie Zellen (VincKO), E-Cadherin-freie Zellen (ECadKO), E-Cadherin-freie und P-Cadherin-herunterregulierte Zellen (ECadKOPCadKD), Zellen, in welchen α -Catenin herunterreguliert wurde (α CatKD) sowie die entsprechenden Kontroll-Keratinozyten (VincCtrl, ECadCtrl).

Da die Zellen für die Durchführung der Zugexperimente auf elastischen Zugkammern kultiviert werden, wurde im Vorfeld ein Adhäsionstest durchgeführt, welcher Aufschluss über die optimale Beschichtung für die verwendeten Keratinozyten gab. Zusätzlich wurde durch den Vergleich des Aktinnetzwerkes sowie der Fokaladhäsionen auf den verschiedenen Substraten überprüft, ob die Kultivierung der Zellen auf elastischen Oberflächen zu einer Veränderung der Adhäsionsstrukturen und des Aktinnetzwerkes führt. Für die Analyse wurden die Proteine Aktin und Vinculin in Zellen auf fibronectin- bzw. kollagenbeschichtetem Glas sowie PDMS immunzytochemisch gefärbt. Sowohl auf fibronectin- als auch auf kollagenbeschichteten Glassubstraten waren 18 Stunden nach Aussaat adhärente Zellen erkennbar. Das Aktinzytoskelett der Zellen war auf beiden Beschichtungen vergleichbar und zeigte unregelmäßig orientierte, die Zelle durchspannende Aktinstressfasern. Diese endeten in vinculinpositiven Strukturen, welche in länglich-elliptischer Form in den Aufnahmen zu sehen waren. Die Zellen auf fibronectinbeschichteten 1:40 PDMS-Substraten waren ebenfalls adhärent, aufgespannt und zeigten ähnliche Aktin- und Vinculinstrukturen. Das Vinculinsignal dieser Zellen markierte elliptische Strukturen, welche sowohl zentral als auch peripher verteilt waren und nahe der Lamelle senkrecht zu dieser orientiert waren. Jede dieser Vinculinstrukturen war mit einer Aktinstressfaser assoziiert,

welche in Ausrichtung, Länge und Form mit denen in Zellen auf Glassubstraten vergleichbar waren. Die Zellen auf kollagenbeschichteten 1:40 PDMS-Substraten hingegen waren deutlich weniger stark aufgespannt als auf fibronektinbeschichteten Substraten oder auf Glas und besaßen eine unregelmäßige Zellform. Das Vinculinsignal in diesen Zellen war ungeordnet und markierte nur wenige spezifische Strukturen. Diese lagen vereinzelt und zeigten eine längliche Morphologie. Aufgrund der guten Vergleichbarkeit des Zytoskeletts von Zellen auf Glas und auf fibronektinbeschichteten PDMS-Substraten, wurde für die Beschichtung der Zugkammern in den folgenden Experimenten Fibronektin verwendet (siehe Abbildung 40).

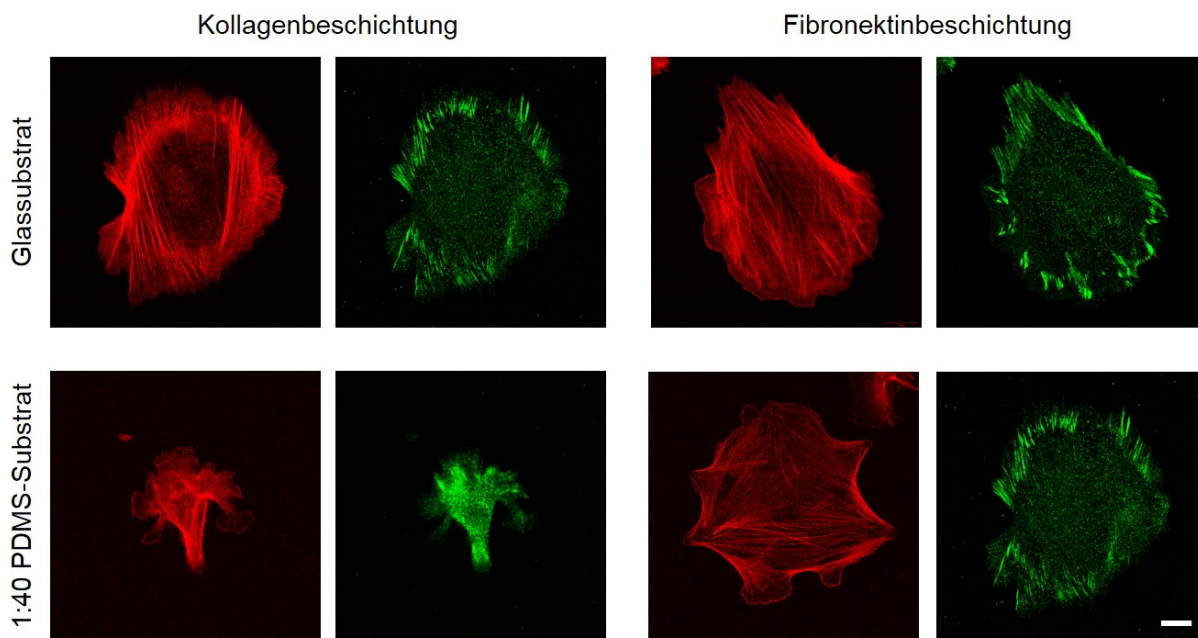


Abbildung 40: Immunfluoreszenzfärbungen von Keratinozyten auf kollagen- und fibronektinbeschichteten Substraten. Immunfluoreszenzaufnahmen von Zellen auf kollagen- und fibronektinbeschichteten Glassubstraten zeigen aufgespannte Zellen, welche von Aktinfasern (rot) durchspannt werden. Vinculinstrukturen (grün), welche Fokaladhäsionen markieren, sind vornehmlich peripher angeordnet. Während Zellen auf kollagenbeschichteten PDMS-Substraten eine deutlich geringere Zellfläche sowie ein unspezifisches Aktin- und Vinculinsignal aufweisen, sind Zellen auf fibronektinbeschichteten PDMS-Substraten aufgespannt und weisen Aktinfasern sowie Vinculinstrukturen auf, welche mit denen von Zellen auf Glassubstraten vergleichbar sind. Maßstab 20 µm.

3.4 Auswirkungen von Kalzium auf die Organisation des Zytoskeletts und auf Adhärenzverbindungen

Die kalziumabhängigen Umstrukturierungen des Aktinnetzwerkes sowie der Adhäsionsstrukturen wurden anhand von Fluoreszenzfärbungen der Proteine Aktin, Paxillin und Vinculin näher analysiert. In Abwesenheit von Kalzium (Kalziumkonzentration $<0,5$ mM) waren in den VincCtrl-Zellen zahlreiche Aktinstressfasern erkennbar, welche die gesamte Zelle durchspannten und eine zufällige Anordnung ohne Vorzugsrichtung aufwiesen. Bei 35% der Zellen war die Konzentration an Stressfasern zentral - in der Nähe des Zellkerns - höher als in der Zellperipherie. Die Paxillin- und Vinculinsignale dieser Zellen waren kolokalisiert und erschienen als länglich-elliptische Strukturen, welche voneinander abgegrenzt werden konnten. Die Strukturen waren in der basalen Ebene der Zellen angeordnet, wo sie über die gesamte Zelle verteilt waren und in peripheren Bereichen eine Orientierung senkrecht zur Lamelle aufwiesen. In der apikalen Ebene dieser Zellen war kein Paxillin- und auch kein Vinculinsignal erkennbar (vergleiche Abbildung 41).

Zwei Stunden nach Kalziumzugabe zeigten die Aktinfasern keine Vorzugsorientierung, waren jedoch verstärkt peripher lokalisiert. Das Paxillinsignal zeigte länglich-elliptische Strukturen, welche peripher, direkt hinter der Lamelle in Gruppen zusammengelagert waren. Zentral unterhalb der Zelle war ein feines, punktförmiges Paxillinsignal erkennbar. Der Großteil des Vinculinsignals war zwei Stunden nach Kalziumzugabe mit dem Paxillinsignal kolokalisiert und zeigte eine ähnliche Verteilung. Das Vinculinsignal markierte elliptische Strukturen, welche klarer voneinander abgrenzbar waren als die Paxillinstrukturen.

Nach sechsstündiger Kalziuminkubation waren die Aktinfasern der Zellen vornehmlich peripher in der Zelle lokalisiert, wo sie parallel-angeordnete Stressfaserbündel bildeten. Zentral über dem Zellkern waren nur wenige Stressfasern lokalisiert. An bestimmten Stellen der Zellgrenzen waren Bereiche, sogenannte Knotenpunkte, erkennbar, in welchen Stressfasern mehrerer Zellen zusammenliefen. Stressfasern unterschiedlicher Zellen, welche im gleichen Aktinknotenpunkt lokalisiert waren, wiesen häufig eine ähnliche Orientierung auf, sodass mehrere benachbarte Zellen häufig eine ähnliche Aktinfaseranordnung aufwiesen. Das Paxillinsignal dieser Zellen wies in der basalen Ebene der Zellen elliptische Strukturen auf, welche vornehmlich peripher lokalisiert waren und klar voneinander abge-

grenzt werden konnten. Das Vinculinsignal dieser Zellen zeigte in der basalen Ebene eine ähnliche Verteilung und war in punktförmigen Strukturen peripher lokalisiert und senkrecht zur Lamelle ausgerichtet. In der apikalen Ebene der Zellen war das Vinculinsignal als feines linienförmiges Signal entlang der Zellgrenzen erkennbar.

Während sechs Stunden nach Kalziumzugabe nur einzelne, punktförmige Vinculinstrukturen entlang der Zellgrenzen erkennbar waren, welche die Zellgrenzen nur partiell bedeckten, stieg der Bedeckungsgrad der Zellgrenzen mit Vinculin in der apikalen Zellebene nach 24-stündiger Kalziuminkubation an. Die linienförmigen Strukturen wurden mit zunehmender Kalziuminkubation länglicher und schmaler und das Vinculinsignal in der basalen Ebene wurde geringer. Die Paxillin- und Aktinlokalisierung waren im Vergleich zur sechsstündigen Kalziuminkubation kaum verändert. Die periphere Anordnung parallel-orientierter Aktinbündel nahm zu, während das Paxillinsignal in der basalen Ebene geringer wurde (vergleiche Abbildung 41).

Der Bedeckungsgrad der gesamten Zellfläche mit Fokaladhäsionen wurde anhand des Paxillinsignals bestimmt. Diese Analysen zeigten, dass dieser Bedeckungsgrad mit steigender Kalziuminkubationszeit abnimmt. Während zwischen null und zwei Stunden Kalziuminkubation kein signifikanter Unterschied des Bedeckungsgrades detektiert wurde, sank dieser nach einer sechs- bis 24-stündigen Kalziuminkubation weiter ab und unterschied sich für alle anderen Bedingungen signifikant voneinander. Der Bedeckungsgrad lag ohne Kalziumeinfluss bei 5,43% ($CI_{95} = 0,24\%$) ($n = 159$), nach zweistündiger Kalziuminkubation bei 5,32% ($CI_{95} = 0,39\%$) ($n = 83$), nach sechsstündiger bei 4,37% ($CI_{95} = 0,24\%$) ($n = 167$) und nach 24-stündiger Kalziuminkubation bei 3,75% ($CI_{95} = 0,28\%$) ($n = 119$) (siehe Abbildung 42). Die Korrelationsanalysen von Vinculin und Paxillin zeigten, dass die Kolokalisation des Paxillin- und Vinculinsignals mit steigender Kalziuminkubationszeit abnimmt (siehe Abbildung 43).

Während ohne Kalziumeinfluss 50,6% ($CI_{95} = 2,4\%$) ($n = 67$) des Paxillinsignals mit dem Vinculinsignal kolokalisiert waren, waren es nach zweistündiger Kalziuminkubation nur noch 42,0% ($CI_{95} = 4,7\%$) ($n = 57$), nach sechs Stunden noch 31,6% ($CI_{95} = 2,8\%$) ($n = 41$) und nach 24-stündiger Kalziuminkubation sogar nur noch 23,2% ($CI_{95} = 5,2\%$) ($n = 13$) (siehe Abbildung 42). Die Kolokalisation von Paxillin und Vinculin unterschied sich hierbei, außer für die 6- und 24-stündige Kalziuminkubation, signifikant zwischen allen

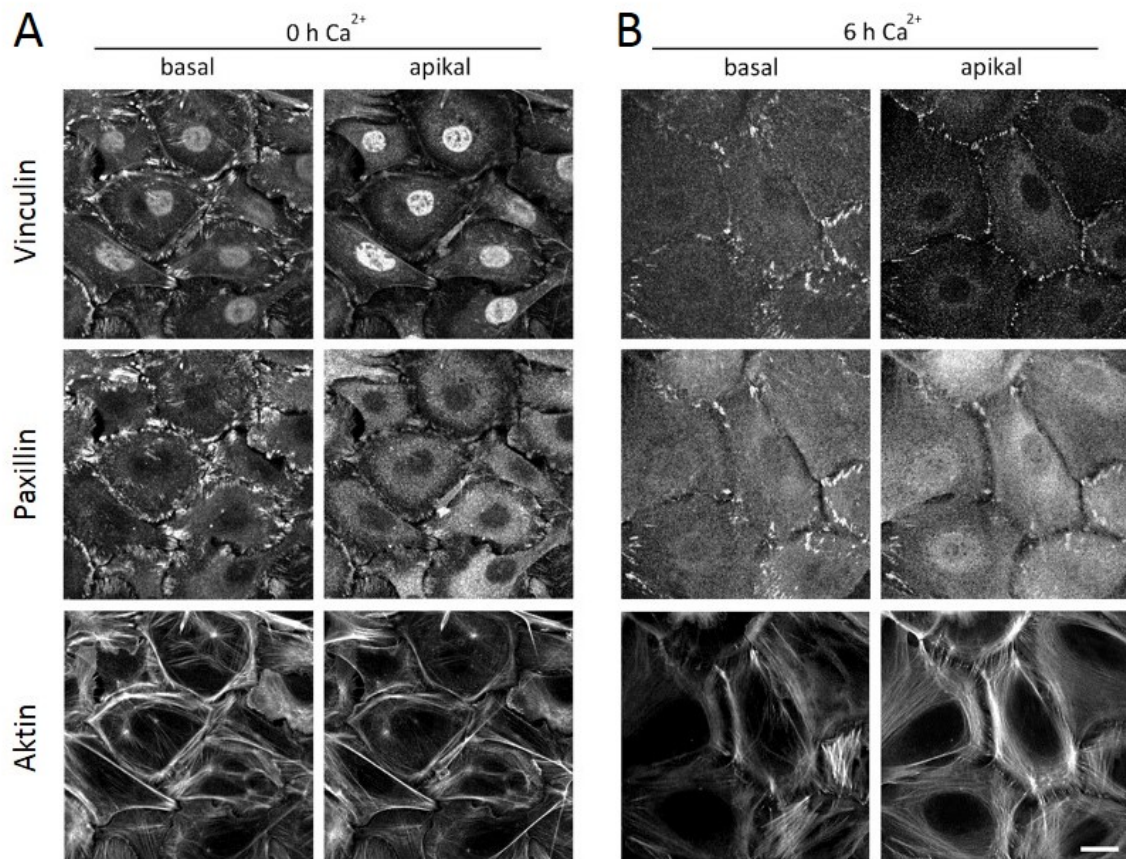


Abbildung 41: Veränderung von Fokaladhäsionen und Aktinnetzwerk unter Kalziueinfluss. (A) Immunfluoreszenzaufnahmen von konfluenten VincCtrl-Zellschichten ohne Kalziueinfluss. Das Vinculin- und Paxillinsignal sind in der basalen Ebene kolokalisiert und peripher angeordnet. Die gesamte Zelle ist von Aktinfasern durchspannt, welche keine Vorzugsorientierung aufweisen. In der apikalen Schicht sind kaum Fokaladhäsions-Marker erkennbar. Die Inkubation der Zellen für sechs Stunden in 1,8 mM Kalziummedium (B) führt zu einer Reduzierung des Vinculin- und Paxillinsignals in der basalen Ebene. Das Vinculinsignal kann in der apikalen Ebene dieser Zellen als linienförmiges Signal entlang von Zellgrenzen detektiert werden, das Paxillinsignal ist in dieser Ebene nur schwach ausgeprägt. Das Aktinnetzwerk der Zellen ist peripher, ringförmig angeordnet. Maßstab 10 µm.

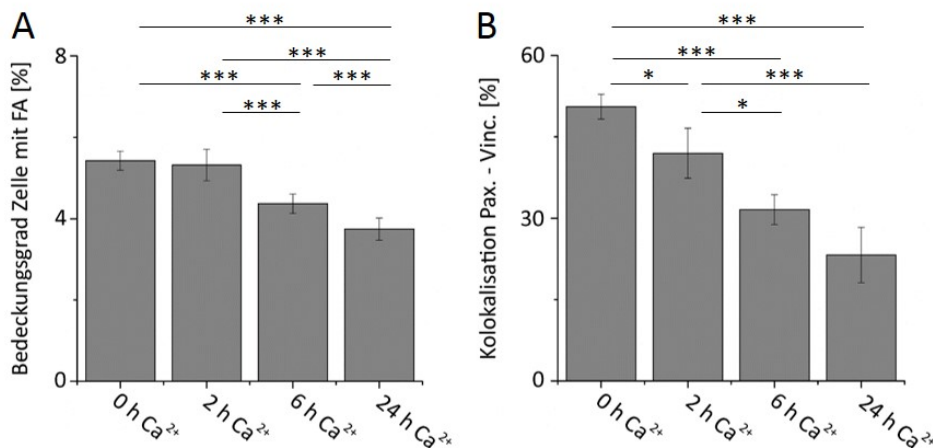


Abbildung 42: Analyse der Fokaladhäsionen unter Kalziumeinfluss. In (A) ist der Bedeckungsgrad der Zellen mit Fokaladhäsionen, gemessen am Paxillinsignal in der basalen Ebene, dargestellt, welcher mit zunehmender Kalziuminkubationszeit abnimmt ($n > 80$). In (B) ist die Kolokalisation von Paxillin und Vinculin in der basalen Ebene dargestellt, welche ebenfalls mit zunehmender Kalziuminkubation abnimmt ($n > 13$).

Bedingungen. Dies bestätigt den subjektiven Eindruck aus den Immunfluoreszenzaufnahmen und zeigt, dass Vinculin aus der basalen in die apikale Ebene transloziert, wo es an kalziumabhängige Adhäsionsverbindungen koppelt.

Die periphere Lokalisation des Aktinnetzwerkes unter Kalziumeinfluss wurde mit Hilfe des Aktin-Anordnungs-Parameters genauer analysiert. Dieser stellt ein Maß für die Lokalisation des Aktinsignals innerhalb der Zelle dar und deutet bei negativen Werten auf eine hohe Aktinkonzentration im Zentrum der Zelle und eine niedrige Konzentration in peripheren Bereichen hin, und bei positiven Werten auf eine peripher höhere Aktinkonzentration verglichen mit dem Zentrum der Zelle. Ohne den Einfluss von Kalzium wiesen 64% der Zellen einen positiven Aktin-Anordnungs-Parameter und 35% einen negativen Parameter auf (siehe Abbildung 44). Die Inkubation der Zellen für 24 Stunden in 1,8 mM Kalziummedium führte, wie bereits beschrieben, zu einer Umstrukturierung des Aktinnetzwerkes und einer Verschiebung des Aktinsignals in periphere Bereiche der Zelle. Diese Verschiebung wird anhand des Aktin-Anordnungs-Parameters deutlich, welcher zu diesem Zeitpunkt für 98,8% der Zellen positive Werte aufweist (siehe Abbildung 44).

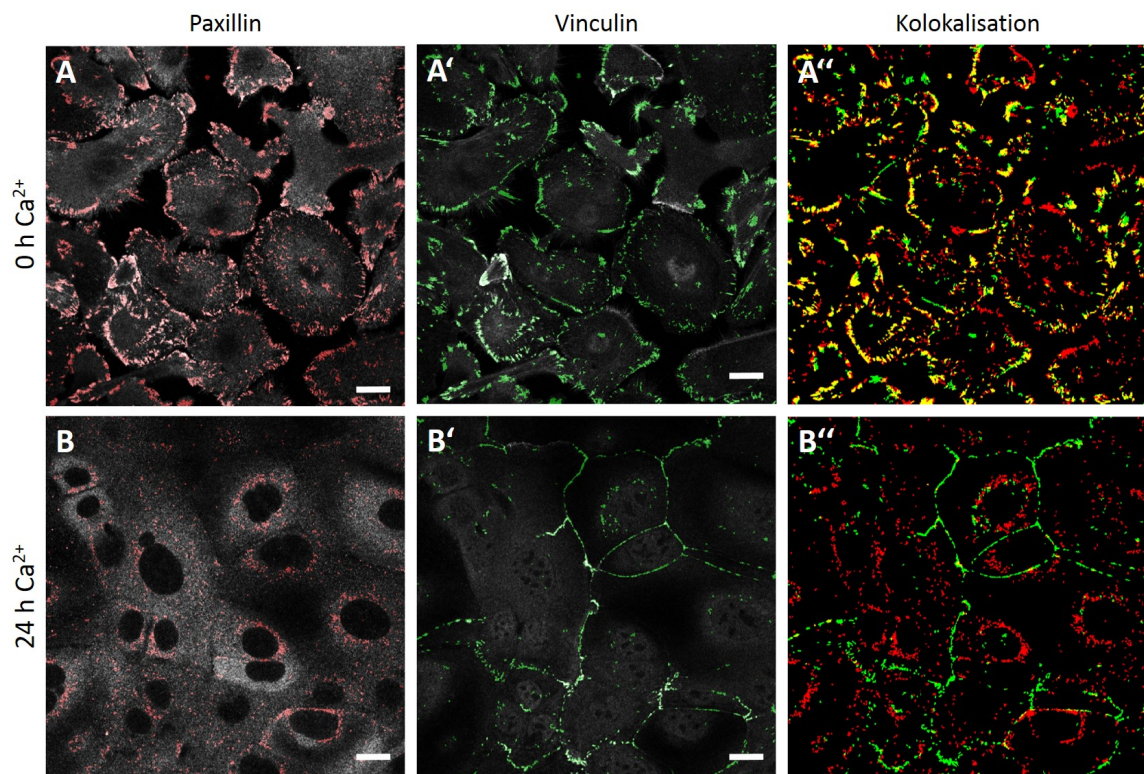


Abbildung 43: Kokalisation des Paxillin- und Vinculinsignals in Abhängigkeit von Kalzium. Für die Analyse der Kokalisation des Paxillin- und Vinculinsignals wurden diese Proteine immunzytochemisch fluorenszenzmarkiert und die entsprechenden Strukturen in den Aufnahmen maskiert (siehe hierzu 2.6.2 auf Seite 51). In rot sind Paxillinstrukturen, in grün Vinculinstrukturen markiert. Rechts in der Abbildung ist die Überlagerung des Paxillin- und Vinculinsignals dargestellt. Bereiche, in welchen die beiden Proteine kokalisiert sind, sind gelb gekennzeichnet. Während ohne den Einfluss von Kalzium etwa die Hälfte des Paxillinsignals mit dem Vinculinsignal kokalisiert ist, sind nach 24-stündiger Kalziuminkubation kaum noch kokalisierte Strukturen erkennbar. Maßstab 20 μm .

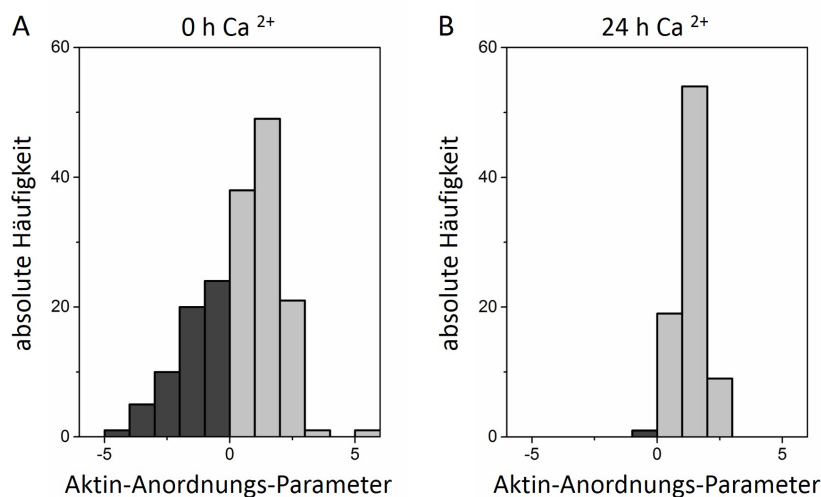


Abbildung 44: Analyse der Aktinanordnung unter Kalziumeinfluss. (A) Histogramm der Aktin-Anordnungs-Parameter für Zellen ohne Kalziumeinfluss ($n = 170$). (B) Histogramm der Aktin-Anordnungs-Parameter für Zellen nach 24-stündiger Kalziuminkubation ($n = 83$).

3.5 Kalziuminduzierte Veränderungen der Aktinfaserreorientierung

Die kalziuminduzierte Umstrukturierung des Aktinnetzwerkes sowie die Translokation des Fokaladhäsionsproteins Vinculin sind auf die Ausbildung kalziumabhängiger Zell-Zell-Adhäsionen zurückzuführen. Die Entstehung von Adhäsionsstrukturen ist *in vivo* für die Entwicklung einer funktionellen Haut essentiell und stellt einen wichtigen Schritt in der Differenzierung der Keratinozyten dar. Aus diesem Grund wurde der Einfluss dieses physiologischen Differenzierungsprozesses auf die Reorientierung der Aktinfasern nach zyklischer Dehnung näher analysiert. Hierfür wurden Keratinozyten auf elastische Zugkammern ausgesät und zyklisch gedehnt. Anschließend wurde die Orientierung der Aktinfasern in immunzytochemischen Färbungen dieser Zellen analysiert. Die Orientierung der Fasern wird hierbei im Verhältnis zur Zugrichtung beschrieben, wobei Aktinfasern mit einer Orientierung von 0° parallel zur Zugrichtung, Fasern mit einer Orientierung von 90° senkrecht zur Zugrichtung ausgerichtet sind. Als Kontrolle wurde die Orientierung der Aktinfasern von Zellen auf Zugkammern ohne Dehnung, in Abwesenheit von Kalzium analysiert. Das Aktinnetzwerk dieser Zellen zeigte Stressfasern, welche unregelmäßig über die gesamte Zelle verteilt waren und keine Vorzugsrichtung aufwiesen.

Die Inkubation mit 1,8 mM Kalzium für 6 Stunden führte, wie zuvor beschrieben, zu einer

Umstrukturierung des Zytoskeletts. Die Winkelverteilung der Aktinfasern war mit denen der Kontrollzellen vergleichbar und zeigte keine Vorzugsorientierung (siehe Abbildung 45). Die zyklische Dehnung der Zellen für vier Stunden (300 mHz, 14%) ohne den Einfluss von Kalzium führte zu einer Reorientierung der Aktinfasern. Die zuvor unregelmäßig verteilten Aktinfasern wiesen nach zyklischer Dehnung eine intrazelluläre annähernd parallele Orientierung ungefähr senkrecht zur Zugrichtung auf. 90% der Zellen zeigen Aktinfaserorientierungen im Bereich von 63° bis 90° .

Eine Vorinkubation der Zellen mit Kalzium für zwei Stunden und eine anschließende zyklische Dehnung unter Kalzium für vier Stunden führte ebenfalls zu einer Reorientierung des Aktinnetzwerkes. Nach zyklischer Dehnung waren die Aktinfasern dieser Zellen nahezu senkrecht zur Zugrichtung orientiert, durchspannten die gesamte Zelle und wiesen eine parallele Anordnung auf. Im Vergleich zu nicht gedehnten Zellen, welche nach Kalziuminkubation eine periphere Lokalisierung der Aktinfasern aufweisen, zeigten die gedehnten Zellen auch unter Kalziumeinfluss eine gleichmäßige Verteilung der Aktinfasern über die gesamte Zelle. Einige Aktinfasern benachbarter Zelle zeigten eine ähnliche Orientierung, was auf die Ausbildung von Adhärenzverbindungen schließen lässt (vergleiche Abbildung 45). Bei 90% der Zellen waren die Aktinfasern zwischen 76° und 90° orientiert.

3.6 Lokalisation von Adhäsionsstrukturen und Aktinfilamenten unter dem Einfluss von Kalzium und zyklischer Dehnung

Die detaillierte Untersuchung der Fokaladhäsionen sowie des Aktinnetzwerkes unter Dehnung in Abwesenheit von Kalzium zeigte, dass Zellen auf elastischen Zugkammern ohne Dehnung Fokaladhäsionen ausbilden, in welchen Vinculin und Paxillin kolokalisiert sind. Die Fokaladhäsionen waren als punktförmige Strukturen in der Peripherie der Zellen an den Enden von Stressfasern erkennbar. Die Aktinfasern durchspannten die gesamte Zelle ohne Vorzugsorientierung und waren hierbei ungeordnet verteilt. Die zyklische Dehnung der Zellen für vier Stunden führte zu einer Reorientierung des Aktinnetzwerkes. Die meisten Aktinfasern waren anschließend zum größten Teil senkrecht zur Zugrichtung ausgerichtet (siehe Abbildung 46).

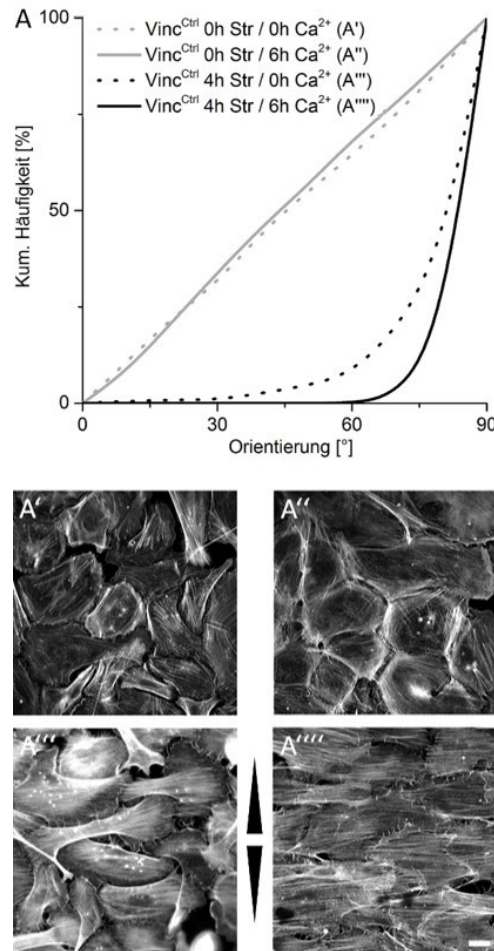


Abbildung 45: Aktinfaserorientierung in VincCtrl-Zellen nach zyklischer Dehnung in Abhängigkeit der Kalziuminkubation. (A) Kumulierte Häufigkeiten der Orientierungen von Aktinfasern ohne Kalziuminkubation und Dehnung (A') ($n = 157$), nach vierstündiger Kalziuminkubation ohne zyklische Dehnung (A'') ($n = 284$), nach vier Stunden zyklischer Dehnung in Abwesenheit von Kalzium (A''') ($n = 416$) sowie nach zyklischer Dehnung unter Kalziumeinfluss (A'''') ($n = 402$) mit dazugehörigen Immunfluoreszenzfärbungen. Die Pfeile markieren die Zugrichtung. Maßstab 20 μm .

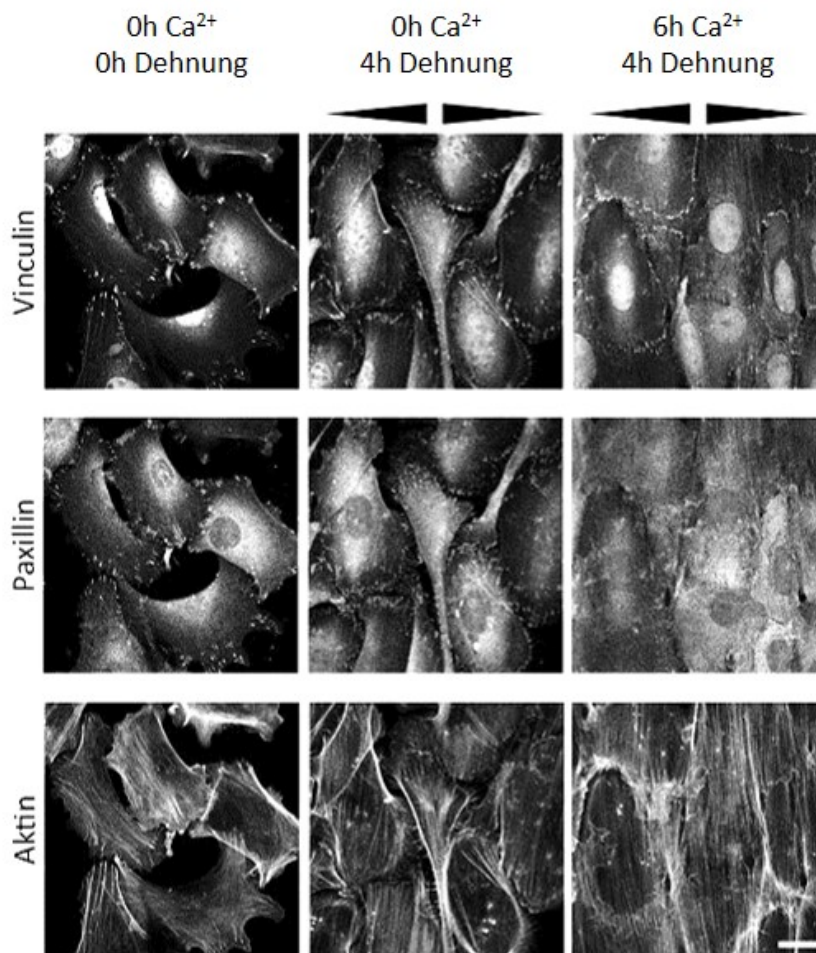


Abbildung 46: Immunfluoreszenzfärbung von Fokaladhäsionen und Aktinnetzwerk unter Einfluss von Kalzium und zyklischer Dehnung. Die erste Spalte zeigt ungedehnte Zellen in Abwesenheit von Kalzium. Vinculin und Paxillin sind als punktförmige Strukturen in der Zellperipherie kolokalisiert, Aktinfasern sind unregelmäßig ohne Vorzugsorientierung angeordnet. Die zweite Spalte zeigt Immunfluoreszenzaufnahmen von Vinculin, Paxillin und Aktin, vier Stunden nach zyklischer Dehnung, ohne Kalziumeinfluss. Die Aktinfasern sind in diesen Zellen senkrecht zur Zugrichtung angeordnet. Die zyklische Dehnung der Zellen unter Kalziumeinfluss (dritte Spalte) führt zu einer linienförmigen Anordnung von Vinculinstrukturen entlang von Zellgrenzen, welche nur noch selten mit Paxillinstrukturen kolokalisiert sind. Das Aktinnetzwerk der Zellen ist senkrecht zur Zugrichtung orientiert. Maßstab 20 µm.

Die Anzahl der Fokaladhäsionen stieg, durch die zyklische Dehnung in Abwesenheit von Kalzium, von 32 ($CI_{95} = 4$) Fokaladhäsionen pro Zelle auf elastischen Zugkammern ohne Dehnung ($n = 66$) auf 45 ($CI_{95} = 6$) Fokaladhäsionen pro Zelle an ($n = 117$). Die Zugabe von Kalzium ohne Dehnung führte zu einer Reduzierung der Fokaladhäsionen auf 28 ($CI_{95} = 4$) Fokaladhäsionen pro Zelle ($n = 69$). Diese Anzahl wurde durch zyklische Dehnung unter Kalziumeinfluss noch weiter auf 19 ($CI_{95} = 5$) Fokaladhäsionen pro Zelle ($n = 51$) reduziert (vergleiche Abbildung 47).

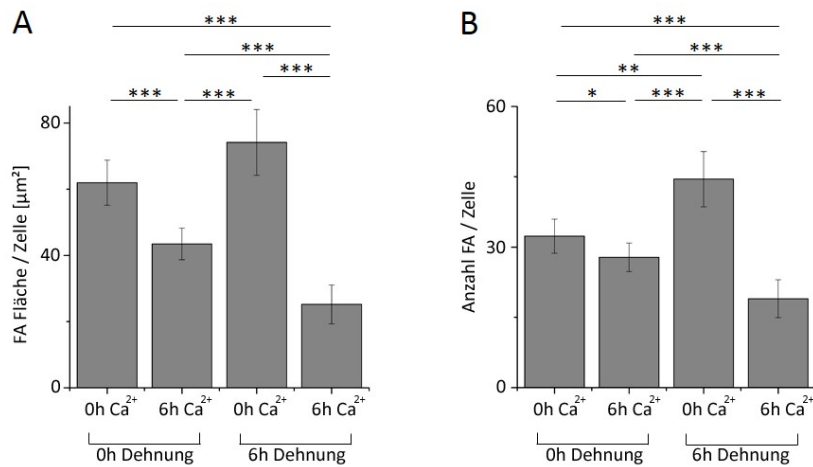


Abbildung 47: Quantitative Analyse der Fokaladhäsionsfläche. (A) Fläche aller Fokaladhäsionen pro Zelle. (B) Anzahl der Fokaladhäsionen pro Zelle gemessen am Paxillinsignal. Während zyklische Dehnung in Abwesenheit von Kalzium zu einem Anstieg der Fläche und Anzahl der Fokaladhäsionen führt, nimmt die Fläche der Fokaladhäsionen sowie deren Anzahl ohne Dehnung durch sechsstündige Inkubation mit 1,8 mM Kalziummedium signifikant ab. Dieser Effekt wird durch Dehnung unter Kalziumeinfluss noch verstärkt.

Ebenso stieg die gesamte Fläche der Fokaladhäsionen pro Zelle von $62,0 \mu m^2$ ($CI_{95} = 6,9 \mu m^2$) in Zellen ohne Dehnung ($n = 66$) auf $74,1 \mu m^2$ ($CI_{95} = 10,0 \mu m^2$) in Zellen nach zyklischer Dehnung ohne Kalziumeinfluss ($n = 117$) an und sank durch Kalziuminkubation ohne Dehnung auf $43,5 \mu m^2$ ($CI_{95} = 4,8 \mu m^2$) ($n = 69$) ab. Die zyklische Dehnung unter Kalziumeinfluss führte zu einer Reduzierung der Fokaladhäsionsfläche auf $25,2 \mu m^2$ ($CI_{95} = 5,9 \mu m^2$) pro Zelle ($n = 51$) (siehe Abbildung 47). Die periphere Lokalisation der Fokaladhäsionen ist unter allen Bedingungen weitestgehend unverändert.

Die Inkubation mit Kalzium während der vierstündigen, zyklischen Dehnung führte ebenfalls zu einer bevorzugten Orientierung der Aktinfasern senkrecht zur Zugrichtung. Im

Vergleich zur Dehnung ohne Kalzium wiesen Aktinfasern benachbarter Zellen häufig die gleiche Aktinfaserorientierung auf. Das Paxillinsignal war deutlich reduziert und es waren nur noch sehr kleine Paxillinstrukturen erkennbar. Das Vinculinsignal war nicht länger als punktförmige Struktur in Fokaladhäsionen sondern als linienförmiges Signal entlang der Zellgrenzen erkennbar (siehe Abbildung 46).

3.7 Kalziuminduzierte Veränderungen der Aktinfaserreorientierung in vinculinfreien Zellen

Da die Zugabe von Kalzium zu einer verstärkten Reorientierung der Aktinfasern und gleichzeitig zu einer veränderten Lokalisation des Vinculinsignals führte, wurde in einem nächsten Schritt die Translokation von Vinculin als mögliche Ursache für die verstärkte Reorientierung untersucht. Hierfür wurden, unter Verwendung der gleichen Parameter wie zuvor bei VincCtrl-Zellen, Zugexperimente an VincKO-Zellen durchgeführt.

Die Aktinfasern der VincKO-Zellen ohne Dehnung wiesen in Abwesenheit von Kalzium sowie nach sechsständiger Kalziuminkubation eine unregelmäßige Anordnung auf und zeigten, vergleichbar mit den VincCtrl-Zellen, eine gleichmäßige Winkelverteilung ohne Vorzugsorientierung (siehe Abbildung 48). Intrazellulär schien das Aktinnetzwerk dieser Zellen ungeordneter und weniger parallel orientiert zu sein als in den entsprechenden VincCtrl-Zellen. Eine vierstündige, zyklische Dehnung der Zellen führt zu einer leichten Reorientierung des Aktinnetzwerkes. 90% der Aktinfasern wiesen hierbei einen Winkel zwischen 31 ° und 90 ° auf. Im Vergleich zu den VincCtrl-Zellen war das Aktinnetzwerk der VincKO-Zellen auch nach vierständiger Dehnung deutlich unregelmäßiger verteilt und wies intrazellulär keine parallele Anordnung der Aktinfasern auf.

Eine vierstündige, zyklische Dehnung unter Kalziumeinfluss führte zu einer Verstärkung der Aktinfaserreorientierung der Zellen, bei welcher 90% der Aktinfasern eine Winkelverteilung zwischen 66 ° und 90 ° aufwiesen (siehe Abbildung 48). Nach zyklischer Dehnung unter Kalziumeinfluss waren mehr Stressfasern erkennbar als nach zyklischer Dehnung in Abwesenheit von Kalzium. Im Gegensatz zu den VincCtrl-Zellen waren die VincKO-Zellen nicht nebeneinander angeordnet, sondern überlagerten stellenweise Bereiche ihrer

Nachbarzellen. Eine Parallelität der Aktinfasern war bei VincKO-Zellen, im Vergleich zu VincCtrl-Zellen, weder intrazellulär noch über die gesamte Zellschicht zu erkennen (siehe Abbildung 48).

3.8 Untersuchung der Aktinfaserreorientierung in einzelnen Zellen und in konfluenten Zellschichten

Die Zugabe von Kalzium führt, wie bereits gezeigt, zu einer verstärkten Reorientierung der Aktinfasern nach zyklischer Dehnung in VincCtrl- und VincKO-Zellen. Der genaue Mechanismus der kalziuminduzierten, verstärkten Reorientierung ist bislang noch unklar. Es ist denkbar, dass die kalziumabhängige Ausbildung von Zell-Zell-Adhäsionen oder ein kalziumvermittelter Signalweg zu einer erhöhten Reorientierung der Aktinfasern führt. Um einen Hinweis auf den zugrundeliegenden Mechanismus zu bekommen, wurden vergleichende Analysen an Einzelzellen und Zellschichten in An- und Abwesenheit von Kalzium an VincCtrl- und VincKO-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen vier Stunden mit einer Frequenz von 300 mHz und einer Amplitude von 14% gedehnt, anschließend immunzytochemisch gefärbt und die Orientierung der Aktinfasern bestimmt.

Die VincCtrl-Einzelzellen zeigten hierbei sowohl mit als auch ohne Kalziumzugabe nach vier Stunden Dehnung eine Reorientierung der Aktinfasern. Die Stressfasern durchspannten die gesamte Zelle und eine Parallelität der Aktinfasern war zu erkennen. Die Orientierungen der Aktinfasern in Ab- und Anwesenheit von Kalzium waren ähnlich und zeigten für 90% der Zellen eine Faserorientierung zwischen 54° - 90° ($n = 241$) bzw. zwischen 60° - 90° ($n = 243$). Das Aktinnetzwerk der VincCtrl-Zellschichten ohne Kalziumeinfluss war mit dem der Einzelzellen vergleichbar und die Aktinfaserorientierung unterscheidet sich nicht signifikant von der der Einzelzellen. 90% der Aktinfasern in Zellschichten ohne Kalzium wiesen eine Orientierung zwischen 68° und 90° ($n = 201$) auf (siehe Abbildung 49). Die Kalziuminkubation führte in VincCtrl-Zellschichten zu einer intrazellulären parallelen Anordnung der Aktinfasern, welche sich auch über die gesamte Zellschicht erstreckte. Die Orientierung der Fasern wich stärker von der Gleichverteilung ab als die Orientierung von Aktinfasern in Zellschichten ohne Kalzium und unterschied sich signifikant von der Faserorientierung in diesen Zellen sowie in Einzelzellen. 90% der Aktinfasern in Zellschichten unter Kalziumeinfluss wiesen eine Orientierung zwischen 78° und 90° auf ($n = 178$).

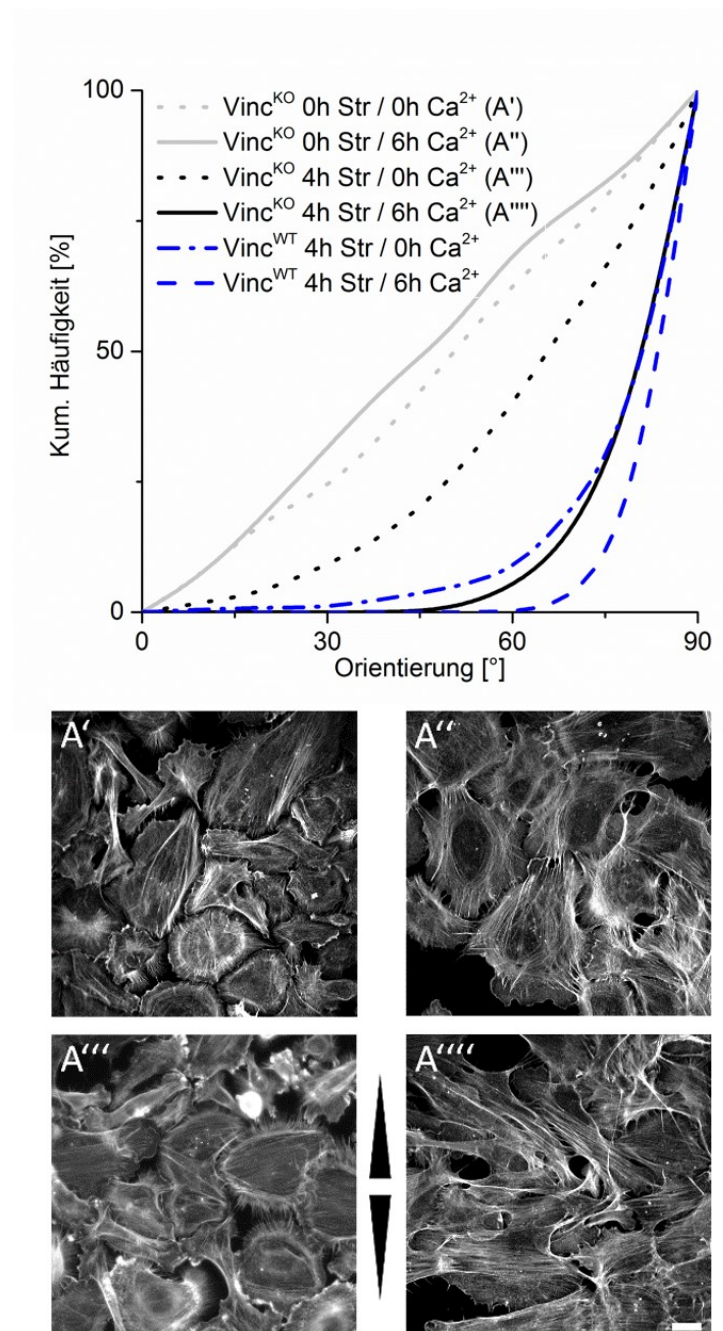


Abbildung 48: Aktinorientierung in VincKO-Zellen nach zyklischer Dehnung in Abhängigkeit der Kalziuminkubation. Kumulierte Häufigkeiten der Orientierungen von Aktinfasern ohne Kalziuminkubation und Dehnung (A') (n = 368), nach vierstündiger Kalziuminkubation ohne zyklische Dehnung (A'') (n = 127), nach vier Stunden zyklischer Dehnung in Abwesenheit von Kalzium (A''') (n = 345) sowie nach zyklischer Dehnung unter Kalziumeinfluss (A''') (n = 224) mit dazugehörigen Immunfluoreszenzfärbungen. Zusätzlich als gepunktet-gestrichelte Linie ist die kumulierte Häufigkeit der Orientierungen der Aktinfasern von VincCtrl-Zellen nach zyklischer Dehnung in Abwesenheit von Kalzium sowie als gestrichelte Linie die Orientierungen der VincCtrl-Zellen nach zyklischer Dehnung in Anwesenheit von Kalzium dargestellt. Die Pfeile markieren die Zugrichtung. Maßstab 20 μm .

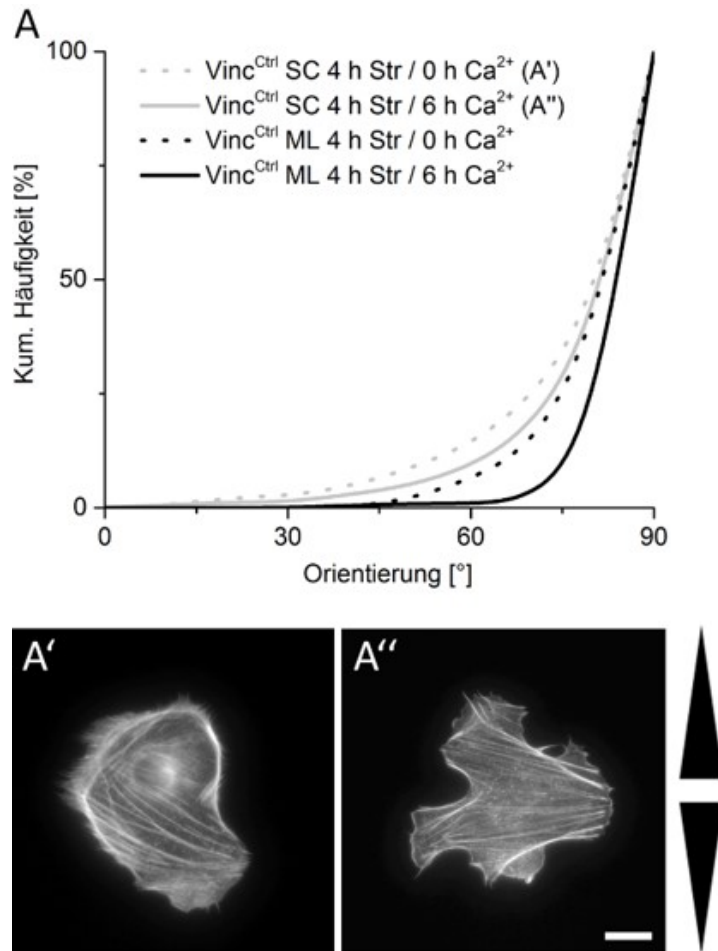


Abbildung 49: Aktinfaserorientierung in Einzelzellen und konfluenten Zellschichten in Ab- und Anwesenheit von Kalzium. (A) Kumulierte Häufigkeiten der Orientierungen von Aktinfasern in VincCtrl-Einzelzellen (SC) in Abwesenheit (A') ($n = 214$) und Anwesenheit (A'') ($n = 243$) von Kalzium sowie die Winkelverteilungen von konfluenten Zellschichten (ML) ohne ($n = 201$) und mit ($n = 178$) Kalziumeinfluss. Immunfluoreszenzfärbung des Aktinnetzwerkes von VincCtrl- Einzelzellen (A' & A'') nach zyklischer Dehnung. Für Immunfluoreszenzaufnahmen des Aktinnetzwerkes in konfluenten Zellschichten siehe Abbildung 45. Die Pfeile veranschaulichen die Zugrichtung. Maßstab 20 µm.

Die kumulierten Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung in VincKO-Zellen haben einen ähnlichen Verlauf wie bei VincCtrl Zellen, weichen aber für alle Bedingungen bei VincKO Zellen weniger stark von der Gleichverteilung ab als bei VincCtrl Zellen. Die Reorientierung der Aktinfasern in VincKO-Einzelzellen mit und ohne Kalzium ist ähnlich und unterschied sich nicht signifikant von der Orientierung der Fasern in Zellschichten ohne Kalziumeinfluss. 90% der Einzelzellen ohne Kalzium haben Orientierungen von 28° bis 90° ($n = 229$), 90% der Einzelzellen mit Kalzium zwischen 22° und 90° ($n = 162$) und 90% der Fasern in Zellschichten ohne Kalziumeinfluss waren zwischen 37° und 90° ($n = 225$) ausgerichtet. Die Aktinfasern in VincKO-Zellschichten unter Kalziuminkubation zeigten eine deutlich stärkere Reorientierung von 63° bis 90° ($n = 185$) und unterschieden sich signifikant von denen der anderen Bedingungen (siehe Abbildung 50).

3.9 Einfluss der E-Cadherin-Deletion auf die Aktinfaserreorientierung

Die Winkelverteilung der Aktinfasern in VincCtrl- und VincKO-Einzelzellen haben gezeigt, dass die Inkubation mit Kalzium alleine nicht zu einer erhöhten Faserreorientierung führt. Auch die bloße Anwesenheit von Nachbarzellen in einer Zellschicht reichte in Abwesenheit von Kalzium nicht aus, um eine verstärkte Reorientierung auszulösen. Erst die Kalziuminkubation von konfluenten Zellschichten führte zu einer erhöhten Reorientierung der Aktinfasern dieser Zellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass kalziumabhängige Adhäsionen für die beschleunigte Reorientierung verantwortlich sind, was durch Dehnungsexperimente an E-Cadherin-freien Zellen überprüft wurde. Hierfür wurden Orientierungsanalysen an Einzelzellen und Zellschichten in Ab- und Anwesenheit von Kalzium an E-Cadherin-freien Zellen und den entsprechenden Kontrollzellen durchgeführt.

Während 90% der Einzelzellen ohne bzw. mit Kalzium Orientierungen zwischen 64° bis 90° bzw. 68° bis 90° aufwiesen und 90% der Aktinfasern der Zellschicht ohne Kalzium zwischen 66° und 90° orientiert waren, wiesen 90% der Stressfasern im Zellschichten mit Kalzium eine Orientierung zwischen 77° und 90° auf. Die grafische Darstellung der kumulierten Häufigkeiten der Aktinfaserorientierungen nach zyklischer Dehnung zeigt eine Überlappung der Kurven der Einzelzellen unter Kalziumeinfluss sowie der Zellschichten ohne Kalzium (siehe Abbildung 51). Wie zuvor für die VincCtrl-Zellen beschrieben, zeigt

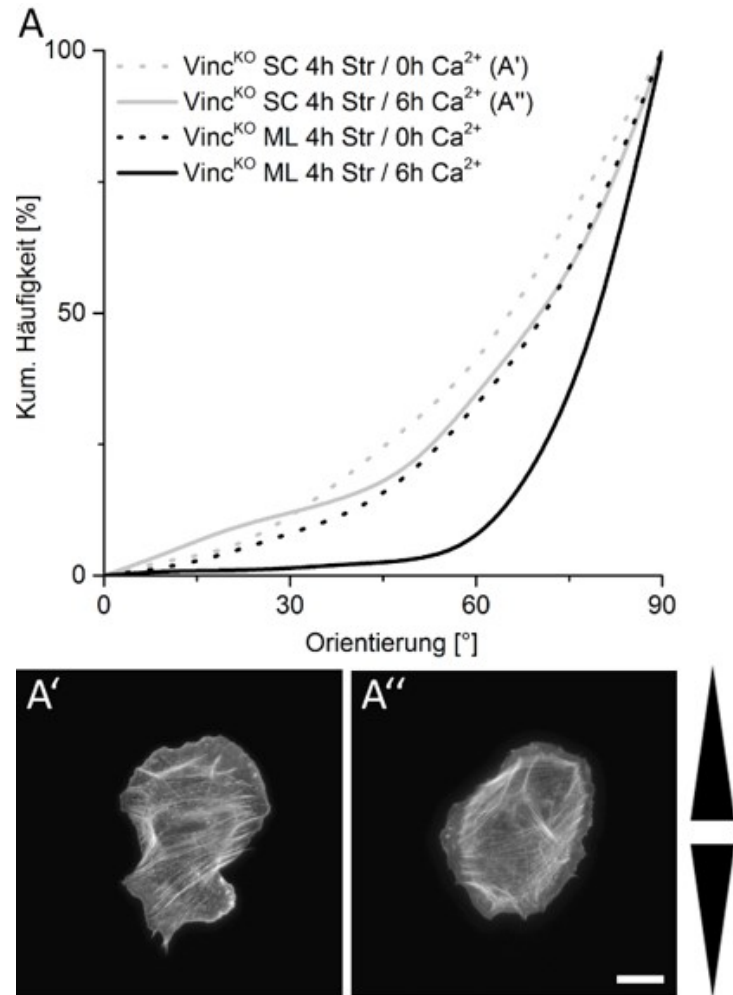


Abbildung 50: Aktinfaserorientierung in Einzelzellen und konfluenten Zellschichten in Ab- und Anwesenheit von Kalzium. (A) Kumulierte Häufigkeiten der Orientierungen von Aktinfasern in VincKO-Einzelzellen (SC) in Abwesenheit (A') (n = 229) und Anwesenheit (A'') (n = 162) von Kalzium sowie die Winkelverteilungen von konfluenten Zellschichten (ML) ohne (n = 225) und mit (n = 185) Kalziumeinfluss. Immunfluoreszenzfärbung des Aktinnetzwerkes von VincKO-Einzelzellen (A' & A'') nach zyklischer Dehnung. Für Immunfluoreszenzaufnahmen des Aktinnetzwerkes in konfluenten Zellschichten siehe Abbildung 48. Die Pfeile veranschaulichen die Zugrichtung. Maßstab 20 μ m.

ten auch die ECadCtrl-Zellen nach zyklischer Dehnung keinen signifikanten Unterschied in der Orientierung der Aktinfasern für Einzelzellen mit und ohne Kalzium sowie für Zellschichten ohne Kalzium. Ausschließlich die Aktinfaserorientierung der Zellschichten mit Kalzium unterschieden sich signifikant von denen anderer Proben und zeigten eine deutlich stärkere Reorientierung der Aktinfasern. Bei E-Cadherin-freien ECadKO-Zellen lag die Faserorientierung für 90% der Zellen für Einzelzellen ohne Kalzium bei 62° bis 90° , für Einzelzellen mit Kalzium zwischen 63° und 90° , für Zellschichten ohne Kalzium zwischen 69° und 90° und für Zellschichten in Anwesenheit von Kalzium bei 77° bis 90° (siehe Abbildung 52). Die Reorientierung der Aktinfasern unterscheidet sich für gleiche Bedingungen nicht signifikant zwischen ECadKO- und ECadCtrl-Zellen. Die grafische Darstellung der kumulierten Häufigkeiten der Aktinfaserorientierungen zeigte auch für ECadKO-Zellen eine Überlagerung der Kurven der Einzelzellen mit Kalzium sowie der Kurven der Zellschichten ohne Kalzium. Die Aktinfasern in den Einzelzellen ohne Kalzium waren weniger stark reorientiert als die Aktinfasern in Zellschichten unter Kalziumeinfluss.

3.10 Ausbildung von Zell-Zell-Adhäsionen in E-Cadherin-freien Zellen

Da die immunzytochemischen Färbungen des Aktinnetzwerkes in ECadKO-Zellen auf Zell-Zell-Adhäsionen benachbarter Zellen in konfluenten Zellschichten hindeuten und sich die Aktinfaserreorientierung nicht signifikant von der Reorientierung der ECadCtrl-Zellen unterschied, wurden weitere vergleichende immunzytochemische Färbungen an ECadKO- und ECadCtrl-Zellschichten durchgeführt, um die Abwesenheit von Zell-Zell-Adhäsionen in diesen Zellen zu überprüfen.

Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen, bei welchen der anti-E-Cadherin Antikörper 610182 (BD Bioscience) verwendet wurde, zeigten in ECadCtrl-Zellschichten ein spezifisches Signal entlang der Zellgrenzen. Das Signal war als linienförmiges Objekt erkennbar. In einigen Bereichen erstreckte es sich über die gesamte Kontaktfläche der Zellmembranen benachbarter Zellen (siehe Abbildung 53). Das Vinculinsignal dieser Zellen war mit dem linienförmigen E-Cadherin-Signal kolokalisiert. Die Aktinfasern dieser Zellen waren peripher angeordnet, wobei einzelne Stressfasern voneinander abgegrenzt werden konnten. Unter gleichen Belichtungseinstellungen war in ECadKO-Zellen kein Signal erkennbar.

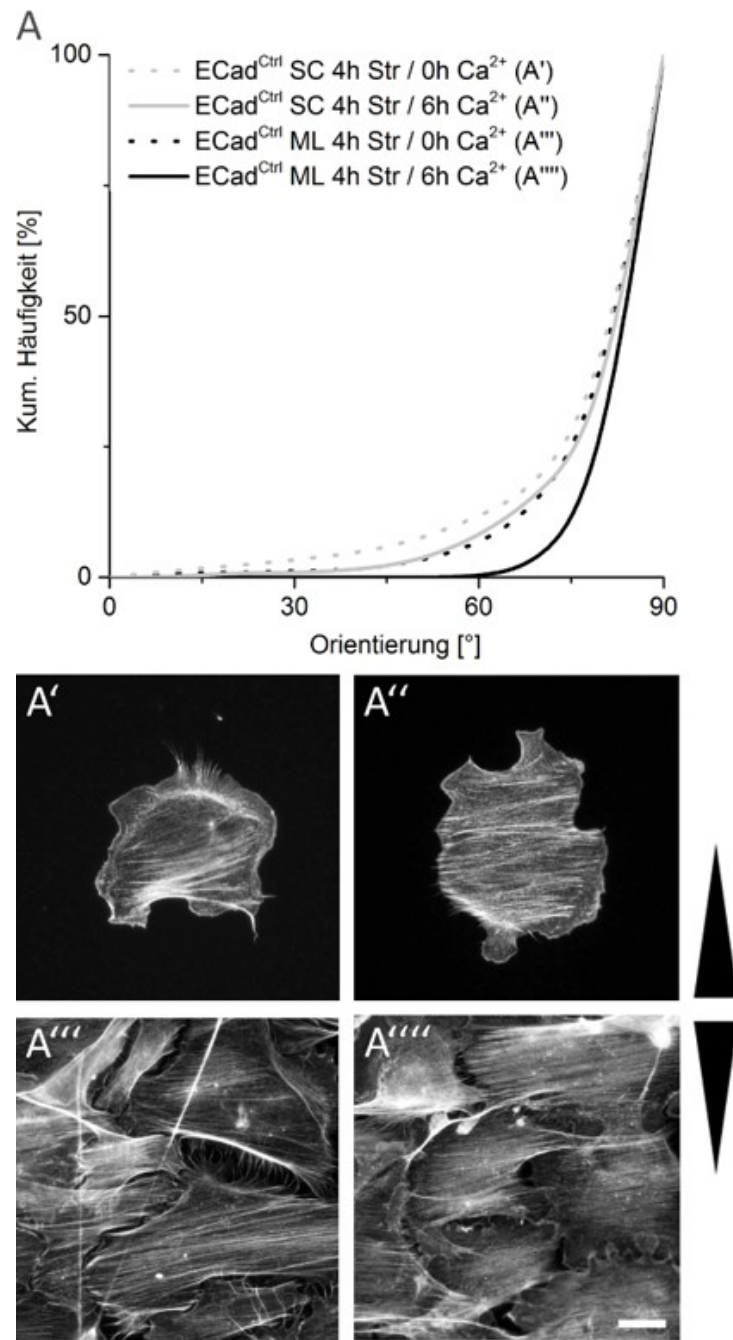


Abbildung 51: Aktinfaserorientierung in ECadCtrl-Einzelnzellen und konfluenten Zellschichten in Ab- und Anwesenheit von Kalzium. (A) Kumulierte Häufigkeiten der Orientierungen von Aktinfasern in ECadCtrl-Einzelnzellen (SC) in Abwesenheit (A') (n = 400) und Anwesenheit (A'') (n = 409) von Kalzium sowie die Winkelverteilungen von konfluenten Zellschichten (ML) ohne (A''') (n = 528) und mit (A'') (n = 501) Kalziumeinfluss. Immunfluoreszenzfärbung des Aktinnetzwerkes von Einzelzellen (A' & A'') sowie von konfluenten Zellschichten (A''' & A'') nach zyklischer Dehnung. Die Pfeile markieren die Zugrichtung. Maßstab 20 µm.

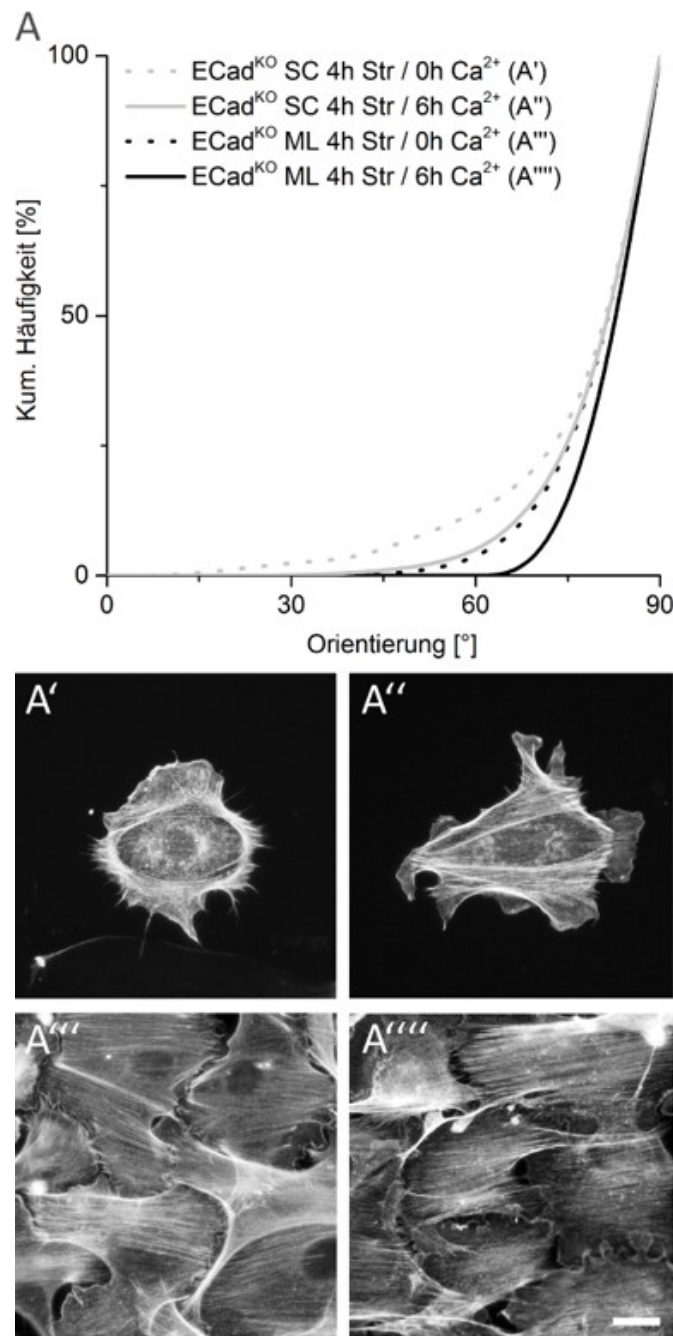


Abbildung 52: Aktinfaserorientierung in ECadKO-Einzelnzellen und konfluenten Zellschichten in Ab- und Anwesenheit von Kalzium. (A) Kumulierte Häufigkeiten der Orientierungen von Aktinfasern in ECadKO-Einzelnzellen (SC) in Abwesenheit (A') (n = 201) und Anwesenheit (A'') (n = 217) von Kalzium sowie die Winkelverteilungen von konfluenten Zellschichten (ML) ohne (A''') (n = 212) und mit (A''') (n = 154) Kalziumeinfluss. Immunfluoreszenzfärbung des Aktinnetzwerkes von Einzelzellen (A' & A'') sowie von konfluenten Zellschichten (A''' & A''') nach zyklischer Dehnung. Die Pfeile markieren die Zugrichtung. Maßstab 20 μm.

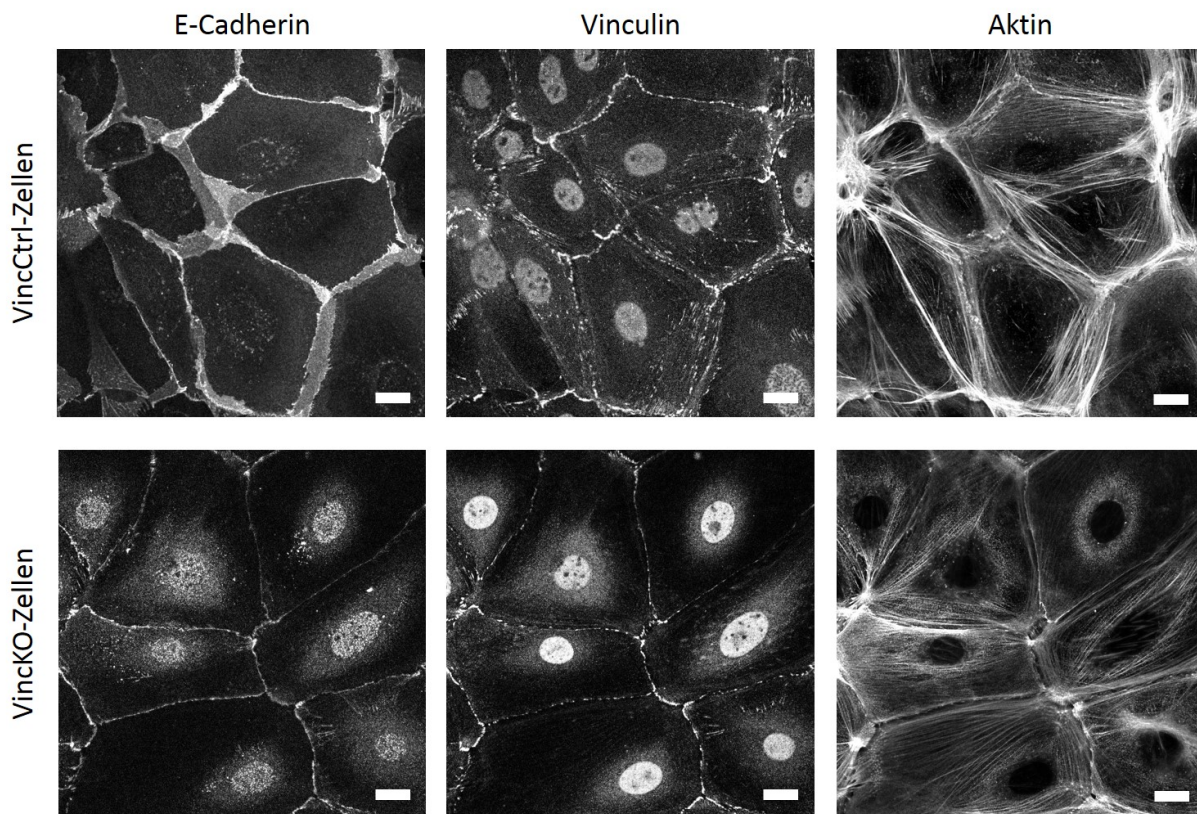


Abbildung 53: Immunfluoreszenzfärbung von E-Cadherin in ECadCtrl- und ECadKO-Zellen. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Kalziuminkubation immunzytochemisch gefärbt. Das Cadherinsignal in ECadCtrl-Zellen ist in konfluenten Zellschichten entlang der Zellmembranen lokalisiert, in ECadKO-Zellen ist das Cadherinsignal nur durch Nachbearbeitung der Bildhelligkeit als linienförmiges Signal entlang der Zellgrenzen erkennbar und ist deutlich schwächer als in ECadCtrl-Zellen. Das Vinculinsignal ist in beiden Zelltypen mit dem E-Cadherinsignal kolokalisiert. Die Aktinfasern sind in ECadCtrl- und ECadKO-Zellen peripher angeordnet und durchspannen die gesamte Zelle. Maßstab 20 μm .

Erst durch eine Anpassung der Helligkeit wurde in ECadKO-Zellschichten ein spezifisches Signal des E-Cadherin-Antikörpers sichtbar. Dieses war linienförmig entlang von Zellgrenzen lokalisiert, fiel jedoch deutlich schwächer aus als bei ECadCtrl-Zellschichten und war stellenweise unterbrochen. Eine Färbung über die gesamte Kontaktfläche der Zellmembran benachbarter Zellen war in ECadKO-Zellschichten nicht zu erkennen (siehe Abbildung 53). Wie in den ECadCtrl-Zellen war das Vinculinsignal auch in ECadKO-Zellen mit dem linienförmigen E-Cadherinsignal kolokalisiert.

Das Aktinnetzwerk dieser Zellen zeigte eine periphere Lokalisation der Aktinfasern, welche in einer Art Ring entlang der Zellmembran lokalisiert waren. In Bereichen entlang der Membran, wo ein verstärktes Vinculin bzw. Cadherinsignal erkennbar war, war auch ein verstärktes Aktinsignal zu beobachten. Da eine unspezifische Bindung des Antikörpers an andere Cadherine nicht ausgeschlossen werden kann, ist anzunehmen, dass es in ECadKO-Zellen möglicherweise zu einer Expression von P-Cadherin kommt, was einen kompensatorischen Effekt hat und zur Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen führt. Da die Bindung des verwendeten E-Cadherin-Antikörpers jedoch augenscheinlich unspezifisch für P-Cadherin ist, ist das Cadherinsignal in den Immunfluoreszenzaufnahmen nur durch starke Nachbearbeitung der Bildhelligkeit zu erkennen.

3.11 Auswirkungen der P-Cadherin-Reduzierung auf die Aktin-faserreorientierung in E-Cadherin-freien Zellen

Da die Deletion von E-Cadherin wahrscheinlich durch die Expression von P-Cadherin kompensiert wird und es dadurch auch in ECadKO-Zellen zur Ausbildung von Adhärenzverbindungen kommen könnte, wurden zur Analyse des Einflusses von Zell-Zell-Kontakten auf die Reorientierung des Aktinnetzwerkes in einem nächsten Schritt ECadKO-Zellen verwendet, in welchen zusätzlich P-Cadherin herunterreguliert wurde. Diese Zellen wurden als Einzelzellen oder konfluente Zellschicht auf Zugkammern ausgesät und in Ab- und Anwesenheit von Kalzium zyklisch gedehnt.

Immunfluoreszenzaufnahmen der ECadKOPCadKD-Zellschichten zeigten eine geringe Distanz zwischen den Zellmembranen benachbarter Zellen. Die Aktinfasern waren nach Deh-

nung in vielen Zellen senkrecht zur Zugrichtung orientiert und innerhalb der Zelle parallel angeordnet. Ein Durchspannen der Aktinfasern von mehreren Zellen wurde nicht beobachtet, was auf die Abwesenheit von aktinassozierten Adhärenzverbindungen in diesen Zellen hindeutet. Die Auswertung der Aktinfaserorientierungen der ECadKOPCadKD-Zellen ergab für Einzelzellen in Abwesenheit von Kalzium für 90% der Zellen eine Faserorientierung zwischen 72° und 90° , in Anwesenheit von Kalzium zwischen 71° und 90° . Die kumulierten Häufigkeiten dieser Orientierungen liegen übereinander und die Winkelverteilungen dieser Zellen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Ähnliche Orientierungen zwischen 69° und 90° wiesen die Aktinfasern der Zellschichten in Abwesenheit von Kalzium auf, welche sich nicht signifikant von denen der Einzelzellen unterscheiden. Auch die Aktinfaserorientierungen der Zellschichten in Anwesenheit von Kalzium unterschieden sich nicht signifikant von den Orientierungen der anderen Proben. Im Vergleich mit den ECadCtrl-Einzelzellen sind alle ECadKOPCadKD-Zellen etwas stärker ausgerichtet, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Die graphische Darstellung der kumulierten Häufigkeiten der Orientierungen der Aktinfasern in ECadCtrl-Zellschichten und ECadKOPCadKD-Zellschichten in Abwesenheit von Kalzium zeigte eine Überlagerung der beiden Verteilungen. Die Zellschichten der ECadKOPCadKD-Zellen zeigten auch nach Zugabe von Kalzium keine verstärkte Orientierung der Aktinfasern verglichen mit den entsprechenden Einzelzellen und den Zellschichten ohne Kalzium, während die Kalziuminkubation in ECadCtrl-Zellschichten zu einer signifikant stärkeren Reorientierung der Aktinfasern im Vergleich zu ECadKOPCadKD-Zellschichten führte (siehe Abbildung 54).

3.12 Einfluss der α -Catenin-Reduzierung auf die Aktinfaserreorientierung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die kalziumabhängige Ausbildung von aktinassozierten Adhärenzverbindungen zu einer verstärkten Reorientierung der Aktinfasern durch zyklische Dehnung führt, während die Abwesenheit von Zell-Zell-Kontakten in ECadKOPCadKD-Zellen die Reorientierung reduziert. Grundvoraussetzung für die Reak-

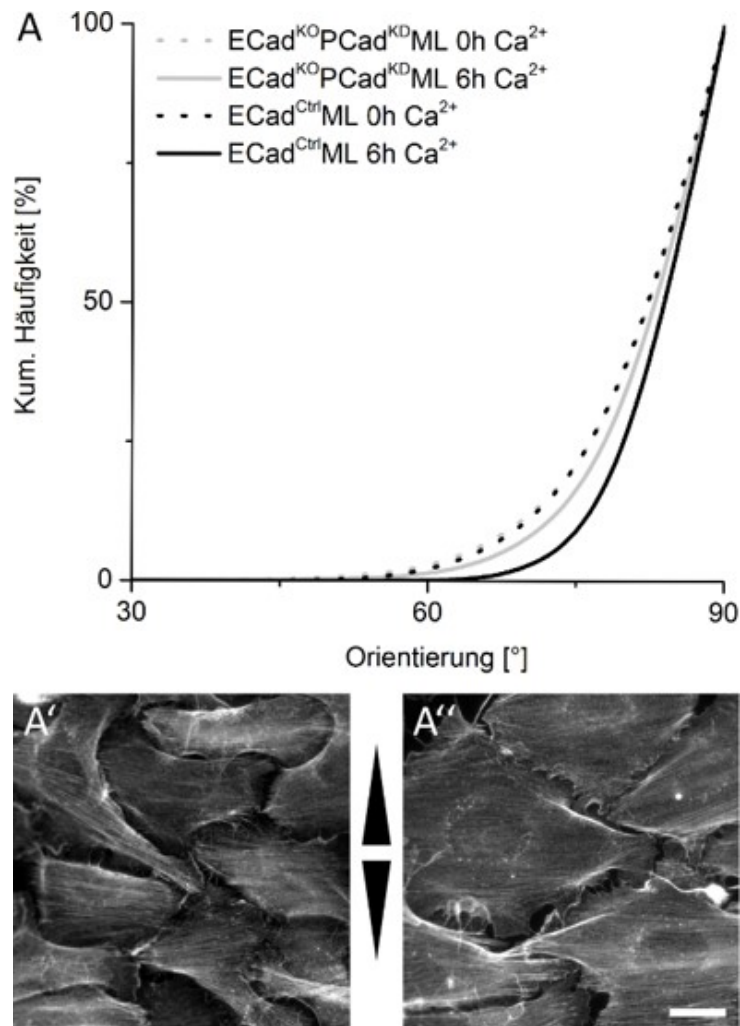


Abbildung 54: Aktinfaserorientierung in Abhängigkeit von Zell-Zelladhäsionen. (A) Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierungen in ECadKOPCadKD-Zellschichten (ML) in Abwesenheit (A') ($n = 296$) und Anwesenheit (A'') ($n = 290$) von Kalzium sowie die Häufigkeiten von ECadCtrl-Zellschichten ohne ($n = 528$) und mit ($n = 501$) Kalziumeinfluss. Entsprechende Immunfluoreszenzfärbungen des Aktinnetzwerkes von ECadKOPCadKD-Zellschichten. Die Pfeile markieren die Zugrichtung. Maßstab 20 μm .

tion auf mechanische Einflüsse sind mechanosensitive Strukturen, welche Reize wahrnehmen und weiterleiten können. Für die fokalen Adhäsionsproteine Vinculin und p130Cas konnte eine Mechanosensitivität bereits nachgewiesen werden [91] und auch für das Adhärenzverbindungsprotein α -Catenin ist eine Mechanosensitivität beschrieben [40] [64]. Ob dieses mechanosensitive Protein an der verstärkten Ausrichtung des Aktinnetzwerkes unter Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten verantwortlich ist und ob bereits das Fehlen von α -Catenin in Adhärenzverbindungen ausreicht, um trotz der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten die Reorientierung des Aktinnetzwerkes infolge zyklischer Dehnung zu reduzieren, wurde im Folgenden näher analysiert.

Zur Generierung von α CatKD-Zellen wurde mittels fusogener Liposomen siRNA gegen α -Catenin in ECadCtrl-Zellen eingebracht (siehe 2.2.6 auf Seite 41). Immunfluoreszenzaufnahmen der α CatKD-Zellen zeigten selbst nach zyklischer Dehnung eine unregelmäßige, ungerichtete Anordnung der Aktinfasern. Die Zellen lagen, anders als bei ECadCtrl-Zellen, nicht aufgespannt nebeneinander, sondern waren ungeordnet und überlagerten sich teilweise. Zwischen den Zellmembranen der α CatKD-Zellen war ein geringer Abstand erkennbar. Aktinfasern, welche augenscheinlich mehrere Zellen durchspannten, wurden nicht nachgewiesen.

Die kumulative Häufigkeit der Aktinfaserorientierung nach zyklischer Dehnung zeigte sowohl für Einzelzellen als auch für Zellschichten mit und ohne Kalzium vergleichbare Winkelverteilungen, welche sich nicht signifikant voneinander unterschieden. 90% der Aktinfasern in Einzelzellen in Ab- bzw. Anwesenheit von Kalzium wiesen eine Orientierung zwischen 64° und 90° bzw. 67° und 90° auf. Die kumulierten Häufigkeiten zeigen ähnliche Verläufe und es war kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Verteilungen nachweisbar. Im direkten Vergleich mit den Kontrollzellen zeigte sich, dass die kumulierten Winkelverteilungen von ECadCtrl-Zellschichten ohne Kalzium und die der α CatKD-Zellschichten sehr ähnlich sind. Die Orientierungen von 90% der Zellen lagen hierbei für ECadCtrl-Zellen zwischen 66° und 90° und für α CatKD-Zellen zwischen 67° und 90° . Ein signifikanter Unterschied besteht nicht.

Die Verteilungen der ECadCtrl-Zellschicht mit Kalzium wich, verglichen mit den anderen, deutlich stärker von der Gleichverteilung ab, was eine stärkere Reorientierung der Aktinfasern in diesen Zellen kennzeichnet. Die Orientierungen für 90% der Aktinfasern lag in

diesen Zellen bei 77° bis 90°. Die Aktinfasern der ECadCtrl-Zellschichten mit Kalzium waren signifikant stärker ausgerichtet als die Einzelzellen mit und ohne Kalzium sowie die Zellschichten ohne Kalzium beider Zelltypen (siehe Abbildung 55).

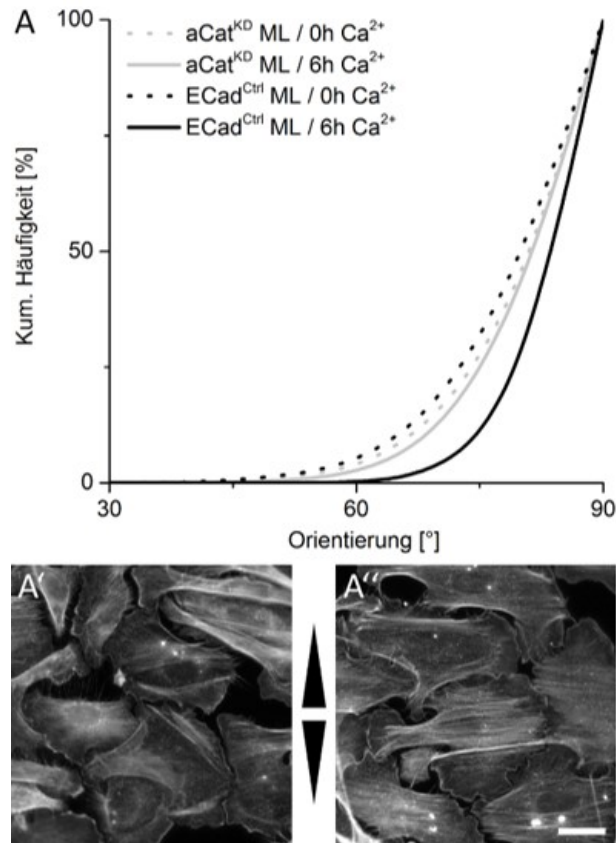


Abbildung 55: Aktinfaserorientierung in Abhängigkeit von α -Catenin. (A) Kumulierte Häufigkeiten der Orientierungen von Aktinfasern in $\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}$ -Zellschichten (ML) in Abwesenheit (A') ($n = 257$) und Anwesenheit (A'') (244) von Kalzium sowie Aktinfaserorientierungen von ECadCtrl-Zellschichten mit und ohne Kalziumeinfluss. Die Immunfluoreszenzfärbungen des Aktinnetzwerkes von $\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}$ -Zellschichten zeigen in Abwesenheit (A') und Anwesenheit (A'') Maßstab 20 μm .

3.13 Vergleich der maximalen Aktinfaserreorientierung in VincCtrl- und VincKO-Zellen

Die bisherigen Experimente zeigen, dass eine kalziumabhängige Ausbildung von aktinassoziierten Zell-Zell-Verbindungen zu einer stärkeren Reorientierung der Aktinfasern infolge

zyklischer Dehnung führt. Unklar ist bislang, ob es sich hierbei um eine beschleunigte Reorientierung handelt oder ob die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten als zusätzlicher Mechanosensor zu einer verstärkten Reorientierung und einer Veränderung der maximalen Ausrichtung führt. Zudem ist noch nicht vollständig geklärt, ob allein das Fehlen von Vinculin in Fokaladhäsionen die Reorientierung des Aktinnetzwerkes verlangsamt oder gar zu einer insgesamt schwächeren Reorientierung führt.

Zum Vergleich der maximalen Ausrichtung der Aktinfasern in VincCtrl- und VincKO-Zellen wurden die Zellen in Ab- und Anwesenheit von Kalzium für 4, 8 und 16 Stunden mit einer Amplitude von 14% und Frequenzen von 100, 300 und 600 mHz gedehnt. Die Erhöhung von Dehnungsdauer und Frequenz verstärkt die Reorientierung und ermöglichte so den Vergleich der maximalen Ausrichtung des Aktinnetzwerkes.

Bei VincCtrl-Zellen wichen die kumulierten Häufigkeiten der Orientierungen der Aktinfasern bei kurzen Dehnungsdauern von vier Stunden deutlich voneinander ab, während sich die Häufigkeiten nach 8 und 16 Stunden zyklischer Dehnung für die verschiedenen Frequenzen immer stärker aneinander annäherten (siehe Abbildung 56). Nach vierstündiger Dehnung unterschieden sich die Aktinorientierungen innerhalb der VincCtrl-Zellen signifikant für allen Frequenzen. Nach 8 Stunden zyklischer Dehnung unterschieden sich die Orientierungen der Aktinfasern, in Abwesenheit von Kalzium, in VincCtrl-Zellen für hohe Frequenzen von 300 mHz und 600 mHz nicht mehr signifikant voneinander, nach 16 Stunden zyklischer Dehnung war nur noch zwischen der niedrigsten (100 mHz) und der höchsten (600 mHz) Frequenz ein signifikanter Unterschied in der Reorientierung des Aktinnetzwerkes dieser Zellen zu erkennen, wobei die Effektgröße jedoch vernachlässigbar war (siehe Abbildung 56).

Die kumulierten Häufigkeiten der Winkelverteilungen von Aktinfasern, geordnet entsprechend der Frequenzen, zeigten, dass die Reorientierung in VincCtrl-Zellen in Abwesenheit von Kalzium bei niedrigen Frequenzen (100 mHz) zeitabhängig ist und mit zunehmender Dehnungsdauer signifikant ansteigt, während bei hohen Frequenzen (600 mHz) bereits nach vier Stunden alle Zellen eine maximale Aktinreorientierung erreicht haben (siehe Abbildung 57). Für alle Frequenzen wiesen die Kurven der kumulierten Aktinfaserorientierungen für 8 und 16 Stunden sehr ähnliche Verläufe auf, was darauf schließen lässt, dass die maximale Ausrichtung zu diesem Zeitpunkt bereits erreicht ist, da eine zusätzliche zy-

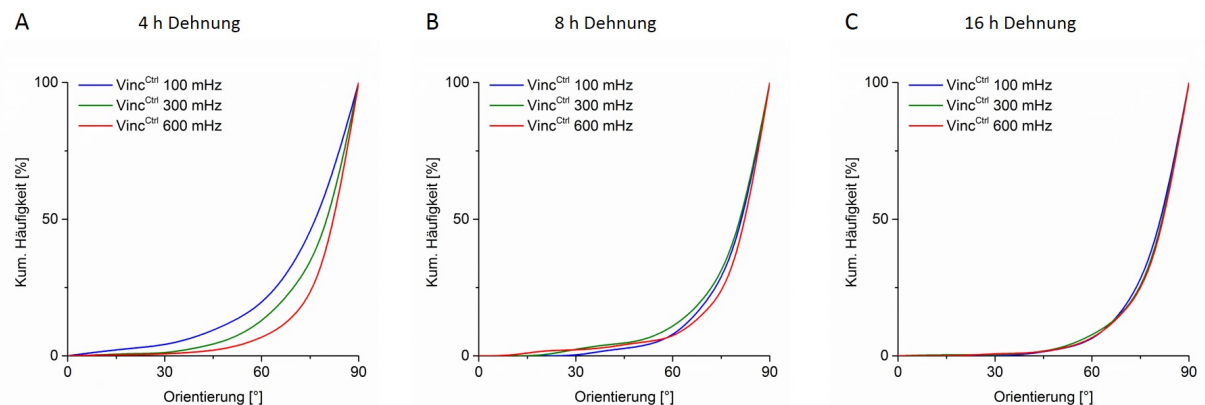


Abbildung 56: Frequenzabhängigkeit der Aktinfaserreorientierung in VincCtrl-Zellen in Abwesenheit von Kalzium. (A) zeigt die kumulierten Häufigkeiten der Aktinfaserorientierungen von VincCtrl-Zellen nach vierstündiger zyklischer Dehnung ($n_{100\text{mHz}} = 752$; $n_{300\text{mHz}} = 646$; $n_{600\text{mHz}} = 551$), (B) nach achtstündiger ($n_{100\text{mHz}} = 623$; $n_{300\text{mHz}} = 274$; $n_{600\text{mHz}} = 354$) und (C) nach 16-stündiger zyklischer Dehnung ($n_{100\text{mHz}} = 435$; $n_{300\text{mHz}} = 247$; $n_{600\text{mHz}} = 149$).

klische Dehnung nicht mehr zu einer Verstärkung der Aktinreorientierung führt (siehe Abbildung 57).

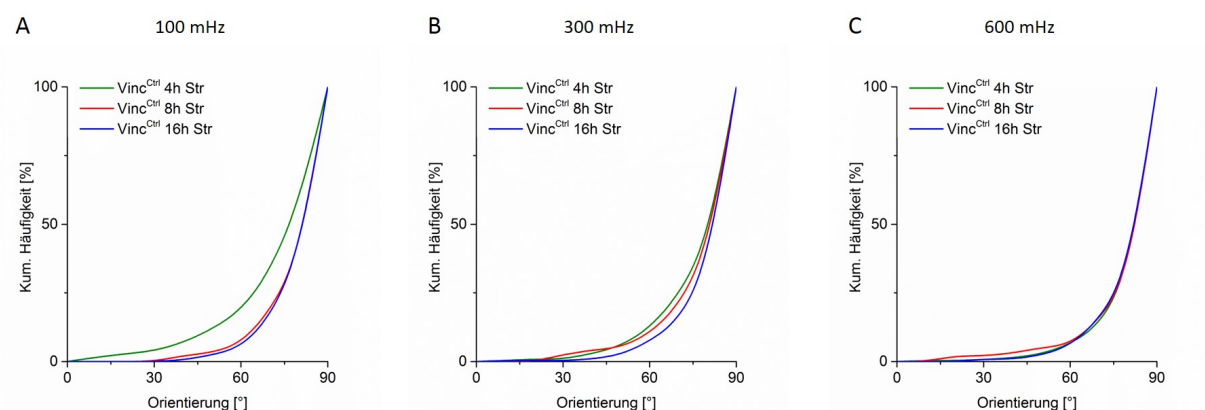


Abbildung 57: Zeitabhängigkeit der Aktinfaserreorientierung in VincCtrl-Zellen in Abwesenheit von Kalzium. (A) zeigt die kumulierten Häufigkeiten der Aktinfaserorientierungen nach zyklischer Dehnung mit einer Frequenz von 100 mHz, (B) von 300 mHz und (C) von 600 mHz ($n =$ siehe 56).

In VincKO-Zellen ist die Reorientierung der Aktinfasern im Vergleich zu VincCtrl-Zellen signifikant verlangsamt und stärker zeitabhängig. Nach vierstündiger, zyklischer Dehnung war die Aktinorientierung der Zellen in Abwesenheit von Kalzium für hohe Frequenzen von 300 mHz und 600 mHz signifikant unterschiedlich, während sie sich für alle anderen

Frequenzen nicht signifikant voneinander unterschied. Erst längere Dehnungsdauern von acht und 16 Stunden führten zu einer stärkeren Aufspaltung der Aktinorientierungen der verschiedenen Frequenzen, wodurch sich die Aktinorientierungen zu diesen Zeitpunkten zwischen allen Frequenzen signifikant voneinander unterschieden. Die Effektgröße hat hierbei zwischen höheren Frequenzen von 300 mHz und 600 mHz jedoch sehr kleine Werte (siehe Abbildung 58).

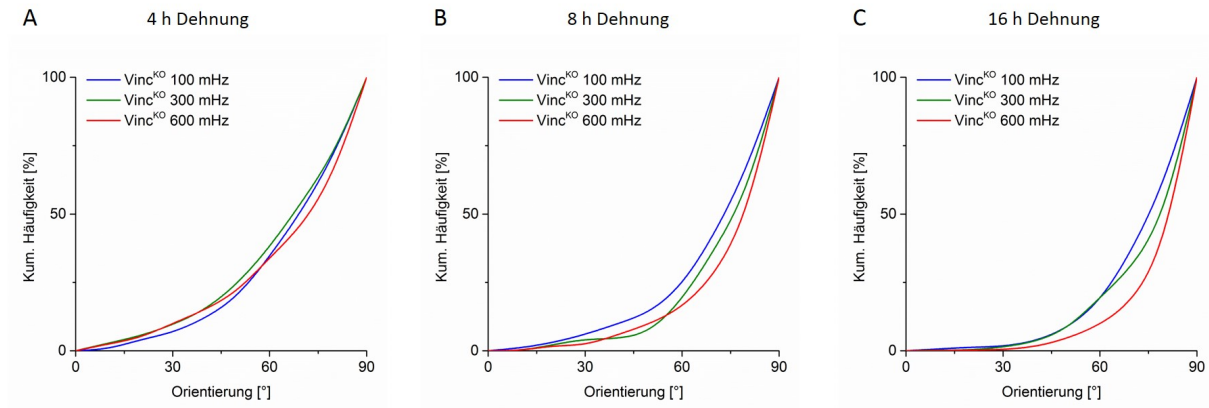


Abbildung 58: Frequenzabhängigkeit der Aktinfaserreorientierung in VincKO-Zellen in Abwesenheit von Kalzium. (A) zeigt die kumulierten Häufigkeiten der Aktinfaserorientierungen von VincKO-Zellen nach vierstündiger zyklischer Dehnung ($n_{100\text{mHz}} = 348$; $n_{300\text{mHz}} = 547$; $n_{600\text{mHz}} = 387$), (B) nach achtstündiger ($n_{100\text{mHz}} = 602$; $n_{300\text{mHz}} = 306$; $n_{600\text{mHz}} = 262$) und (C) nach 16-stündiger zyklischer Dehnung ($n_{100\text{mHz}} = 546$; $n_{300\text{mHz}} = 271$; $n_{600\text{mHz}} = 289$).

Da die Reorientierung des Aktinnetzwerkes in VincKO-Zellen zwischen 8 und 16 Stunden Dehnung noch weiter ansteigt und sich die Orientierungen für diese Zeitpunkte signifikant voneinander unterscheiden, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass die VincKO-Zellen nach 16-stündiger Dehnung bereits ihren Endzustand erreicht haben (siehe Abbildung 60). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine zusätzliche Dehnung zu einer weiteren Reorientierung des Aktinnetzwerkes führt. Aus diesem Grund lässt sich für VincKO-Zellen keine Aussage über einen frequenzabhängigen Endpunkt treffen. Ein Vergleich der maximalen Aktinfaserausrichtung zwischen VincCtrl- und VincKO-Zellen war deshalb trotz erhöhter Dehnungsdauern und Frequenzen nicht möglich.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass sich die Aktinfaserreorientierungen von VincCtrl- und VincKO-Zellen nach 16-stündiger zyklischer Dehnung für alle Frequenzen signifikant voneinander unterscheiden (siehe Abbildung 59).

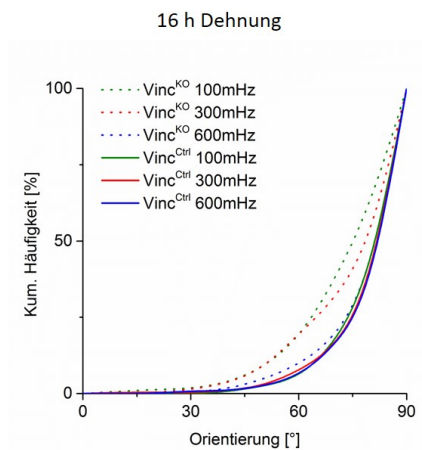


Abbildung 59: Vergleich der Aktinfaserreorientierung in VincCtrl- und VincKO-Zellen in Abwesenheit von Kalzium.

Der direkte Vergleich von VincCtrl- und VincKO-Zellen zeigte zusätzlich für alle Bedingungen eine geringere Orientierung des Aktinnetzwerkes in VincKO-Zellen. Außerdem wiesen diese Zellen eine deutlich stärkere Zeitabhängigkeit der Orientierung sowohl für niedrige als auch für hohe Frequenzen in Abwesenheit von Kalzium im Vergleich zu VincCtrl-Zellen auf (siehe Abbildung 60).

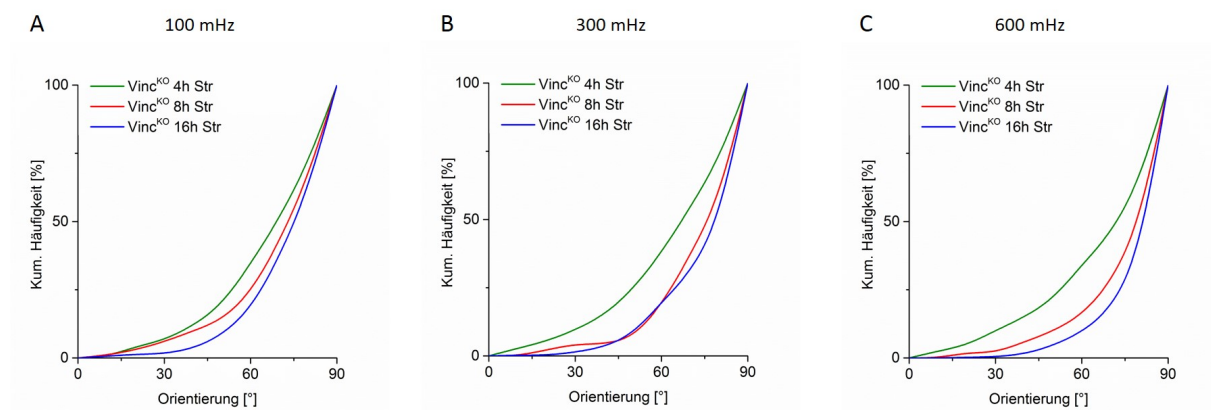


Abbildung 60: Zeitabhängigkeit der Aktinfaserreorientierung in VincKO-Zellen in Abwesenheit von Kalzium. (A) zeigt die kumulierten Häufigkeiten der Aktinfaserorientierungen von VincKO-Zellen nach zyklischer Dehnung mit einer Frequenz von 100 mHz, (B) für eine Frequenz von 300 mHz und (C) für eine Frequenz von 600 mHz (n = siehe 58).

3.14 Einfluss von Kalzium auf die maximale Aktinfaserreorientierung

Die Untersuchung der maximalen Aktinreorientierung unter Kalziumeinfluss sollte zeigen, ob die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zu einer beschleunigten Reorientierung der Aktinfasern führt, oder ob es durch die Adhärenzverbindungen zu einer insgesamt verstärkten Reorientierung mit einer veränderten maximalen Ausrichtung kommt.

Unter Kalziumeinfluss unterschieden sich die Aktinorientierungen in VincCtrl-Zellen für keinen Zeitpunkt zwischen hohen Frequenzen von 300 mHz und 600 mHz. Nach vier- und 16 stündiger Dehnung unterschieden sich die Aktinorientierungen zwischen den Frequenzen von 100 mHz und 600 mHz, während sie sich nach achtstündiger Dehnungsdauer zusätzlich noch zwischen 100 mHz und 300 mHz unterschieden (siehe Abbildung 61).

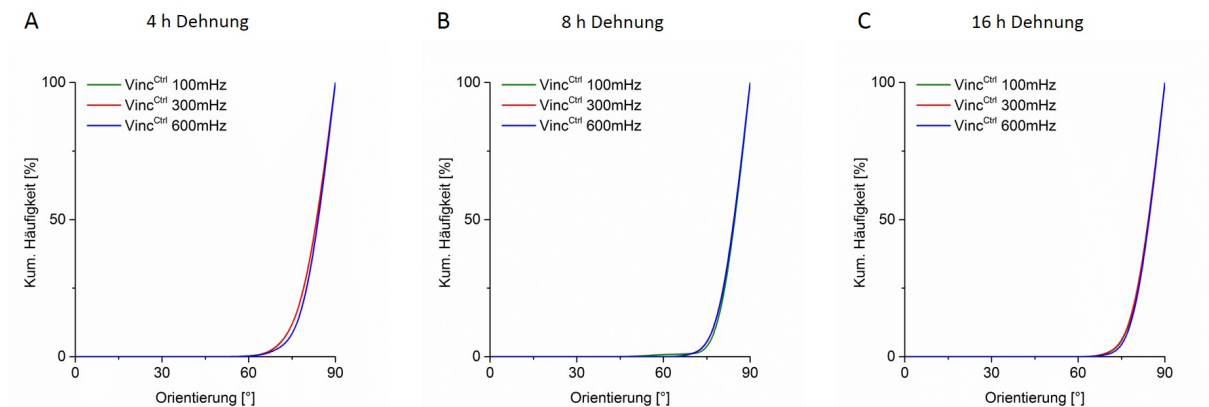


Abbildung 61: Frequenzabhängigkeit der Aktinfaserreorientierung in VincCtrl-Zellen unter Kalziumeinfluss. (A) zeigt die kumulierten Häufigkeiten der Aktinfaserorientierungen von VincCtrl-Zellen nach vierstündiger zyklischer Dehnung ($n_{100\text{mHz}} = 171$; $n_{300\text{mHz}} = 290$; $n_{600\text{mHz}} = 264$), (B) nach achtstündiger ($n_{100\text{mHz}} = 394$; $n_{300\text{mHz}} = 259$; $n_{600\text{mHz}} = 282$) und (C) nach 16-stündiger zyklischer Dehnung ($n_{100\text{mHz}} = 195$; $n_{300\text{mHz}} = 163$; $n_{600\text{mHz}} = 103$).

Insgesamt führte die kalziumabhängige Ausbildung von Adhärenzverbindungen in VincCtrl-Zellen unter allen Bedingungen zu einer signifikanten Erhöhung der Aktinfaserreorientierung verglichen mit der Reorientierung in Abwesenheit von Kalzium. Bei VincCtrl-Zellen wurde, wie zuvor beschrieben, nach 16-stündiger Dehnung die maximale Ausrichtung des Aktinnetzwerkes erreicht. Ein Vergleich dieses Maximums zwischen

VincCtrl-Zellen in Ab- und Anwesenheit von Kalzium zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Endpunkten (siehe Abbildung 62).

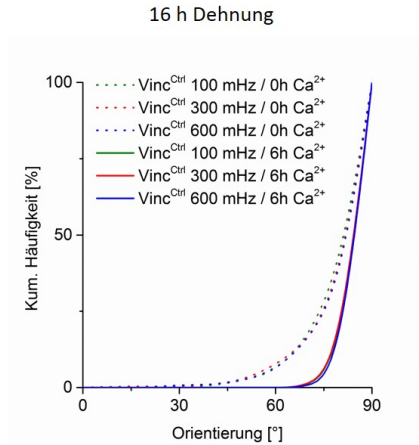


Abbildung 62: Vergleich der Aktinfaserreorientierung in VincCtrl-Zellen in Ab- und Anwesenheit von Kalzium.

Dies lässt darauf schließen, dass die Ausbildung von kalziuminduzierten Adhärenzverbindungen nicht nur zu einer beschleunigten Reorientierung, sondern insgesamt zu einer verstärkten Reorientierung des Aktinnetzwerkes führt. Diese Verstärkung der Reorientierung durch die Ausbildung von Adhärenzstrukturen zeigte sich auch bei vinculinfreien Zellen. Für alle Bedingungen sind auch VincKO-Zellen unter Kalziumeinfluss signifikant stärker reorientiert als VincKO-Zellen in Abwesenheit von Kalzium (siehe Abbildung 63).

Während sich in VincKO-Zellen bei kurzen Dehnungsperioden von vier Stunden in Anwesenheit von Kalzium die Aktinfaserorientierung für alle Frequenzen signifikant voneinander unterscheiden, nähern sich die Ausrichtungen mit steigender Dehnungsdauer immer stärker aneinander an, sodass sich hohe Frequenzen von 300 mHz und 600 mHz nach 16-stündiger Dehnung nicht länger signifikant voneinander unterscheiden (siehe Abbildung 64). Unter Kalziumeinfluss ist der Unterschied zwischen VincCtrl- und VincKO-Zellen geringer und die Winkelverteilungen der beiden Zelltypen nähern sich bei höheren Frequenzen und längeren Dehnungsdauern zunehmend an, wobei sie sich für gleiche Bedingungen selbst nach 16 Stunden zyklischer Dehnung für alle Frequenzen signifikant unterscheiden (siehe Abbildung 65).

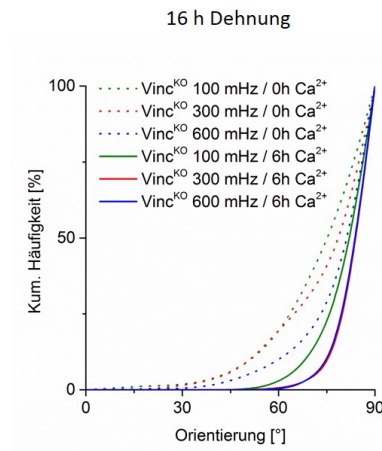


Abbildung 63: Vergleich der Aktfaserreorientierung in VincKO-Zellen in Ab- und Anwesenheit von Kalzium.

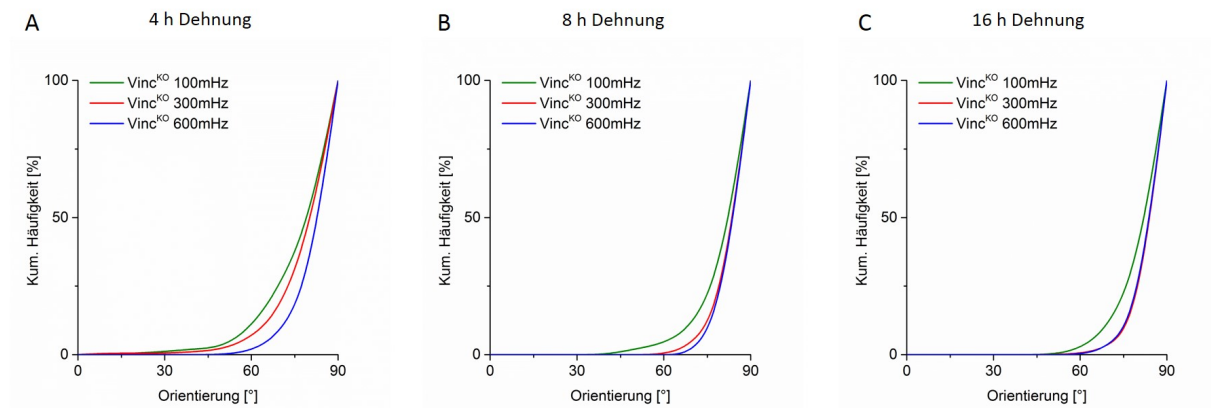


Abbildung 64: Frequenzabhängigkeit der Aktfaserreorientierung in VincKO-Zellen unter Kalziumeinfluss. (A) zeigt die kumulierten Häufigkeiten der Aktfaserorientierungen von VincKO-Zellen nach vierstündiger zyklischer Dehnung ($n_{100\text{mHz}} = 253$; $n_{300\text{mHz}} = 289$; $n_{600\text{mHz}} = 307$), (B) nach achtstündiger ($n_{100\text{mHz}} = 363$; $n_{300\text{mHz}} = 261$; $n_{600\text{mHz}} = 225$) und (C) nach 16-stündiger zyklischer Dehnung ($n_{100\text{mHz}} = 327$; $n_{300\text{mHz}} = 213$; $n_{600\text{mHz}} = 252$).

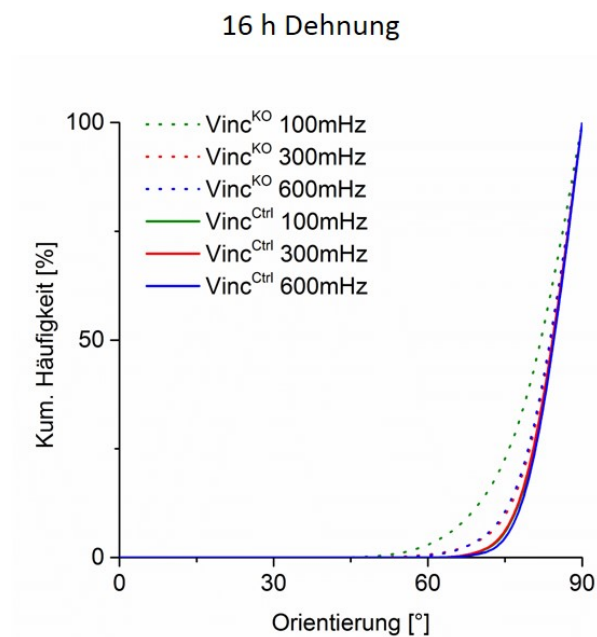


Abbildung 65: Vergleich der Aktinfaserreorientierung in VincCtrl- und VincKO-Zellen unter Kalziumeinfluss.

Die Aktinfaserreorientierung unterschied sich sowohl für VincCtrl- als auch für VincKO-Zellen signifikant zwischen Zellen, welche in Ab- und Anwesenheit von Kalzium zyklisch gedehnt wurden. Bei VincCtrl-Zellen verlief die Reorientierung insgesamt schneller als bei VincKO-Zellen, sodass diese Zellen nach 16-stündiger Dehnung bereits ihre maximale Ausrichtung erreicht hatten. Ein Vergleich der maximalen Ausrichtung des Aktinnetzwerkes in Ab- und Anwesenheit von Kalzium zeigte nach 16-stündiger Dehnung einen signifikanten Unterschied. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von kalziumabhängigen Adhäsionsverbindungen nicht nur zu einer beschleunigten Reorientierung, sondern sogar zu einer insgesamt signifikant stärkeren Reorientierung des Aktinnetzwerkes führt. Dies ist auch bei vinculinfreien Zellen der Fall. Während die Abwesenheit von Vinculin in Fokaladhäsionen ohne den Einfluss von Kalzium zu einer signifikanten Reduzierung der Aktinreorientierung führt, erhöht die Ausbildungen von Adhärenzverbindungen in diesen Zellen die Reorientierung signifikant, wodurch sich die Aktinfaserreorientierung dieser Zellen an die der VincCtrl-Zellen annähert.

4 Diskussion

Die mechanischen Eigenschaften von Keratinozyten wurden in dieser Arbeit mittels Rasterkraftmikroskop analysiert und die Integrität konfluenter Zellschichten durch Zugexperimente näher untersucht. In konfluenten Zellschichten werden die mechanischen Eigenschaften der Zellen durch ein komplexes Zusammenspiel vieler zellulärer Strukturen bestimmt. Modifikationen einzelner Strukturen haben deshalb häufig Auswirkungen auf andere zelluläre Komponenten und führen zu Veränderungen der mechanischen Zelleigenschaften. Der genaue Einfluss verschiedener Keratinmutationen sowie bestimmter Veränderungen von Adhäsionsstrukturen auf die zellulären Eigenschaften sind deshalb in dieser Arbeit von großem Interesse. Durch die Analyse einzelner zellulärer Bestandteile sowie der durch Mutation ausgelösten Veränderungen der Zelleigenschaften wird die Grundlage für die Erforschung und Heilung von zahlreichen Krankheiten geschaffen.

4.1 Einfluss der Plectinreduzierung auf die mechanischen Eigenschaften von Zellen

Dynamische Umbauprozesse des Zytoskeletts als Reaktion auf interne oder externe Reize sind ein komplexes Zusammenspiel vieler zytoskelettaler Komponenten. Als Adapterprotein, welches das Keratin- und Aktinnetzwerk in Keratinozyten miteinander verknüpft, ist das Protein Plectin an Netzwerkumbauprozessen beteiligt und für den Aufbau eines funktionellen Keratinnetzwerkes sowie die intakte Verankerung dieses Netzwerkes in Desmosomen und Hemidesmosomen von großer Bedeutung. Die Relevanz von Plectin für die komplexe Zusammenlagerung eines intakten Zytoskeletts wurde anhand einer shRNA-vermittelten Plectinreduzierung in A431-Zellen näher analysiert. Hierbei wurden die Auswirkungen der Plectinreduzierung auf die Zellelastizität sowie die Zellkraft mittels Rasterkraftmikroskopie und Zellkraftanalyse detailliert untersucht (siehe 3.1.1 und 3.1.2 auf den Seiten 69 und 73).

Die Reduzierung von Plectin in A431-Zellen führte, wie bereits beschrieben, zu einer Verdickung der Keratinfilamentbündel und einer vergrößerten Maschenweite des Keratinnetzwerkes [27] sowie zu einer erhöhten Keratinverzweigungslänge [103]. Eine Veränderung

des dichten, den Zellkern umgebenden Keratinnetzwerkes konnte in den hier verwendeten A431-Zellen in Abwesenheit von Plectin, anders als in Wilhelmsen et al. 2005, jedoch nicht beobachtet werden. Wilhelmsen beschreibt die plectinabhängige, Nesprin 3a-vermittelte Kopplung von Keratin an die Zellkernhülle, welche bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen trotz der Reduzierung von Plectin augenscheinlich unverändert war [118] [103].

Im Gegensatz dazu führte die Herunterregulierung von Plectin, wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben, zu einer Reduzierung der hemidesmosomalen Strukturen [113] [115] [103], welche vermutlich aufgrund der fehlenden plectinvermittelten Kopplung an das Keratinnetzwerk instabil werden und deshalb dislozieren oder abgebaut werden [99]. Da es sich bei Hemidesmosomen um plectinhaltige, kraftübertragende Zell-Matrix-Adhäsionen handelt, wurde der Einfluss der reduzierten Plectinexpression in shPlectin-Zellen auf die Zellkraft dieser Zellen untersucht. Zellkraftanalysen ergaben jedoch für shCtrl- und shPlectin-Zellen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Summe aller kontraktile Kräfte pro Zelle (siehe 2.8 und 3.1.1 auf den Seiten 61 und 69).

Die Herunterregulation von Plectin auf 10-20% reichte folglich nicht aus, um die kraftübertragenden hemidesmosomalen Zell-Matrix-Adhäsionen oder die plectinvermittelte Kraftübertragung vom Keratin- auf das Aktinnetzwerk so stark zu beeinflussen, dass ein Effekt mit den in dieser Arbeit verwendeten Systemen gemessen wurde. Es wäre zudem möglich, dass Hemidesmosomen bei der zellulären Kraftübertragung im Vergleich zu Fokaladhäsionen nur einen geringen Einfluss haben. Dies würde erklären, weshalb es bei shPlectin-Zellen in dieser Arbeit trotz reduzierter hemidesmosomaler Strukturen nicht zu einer Reduzierung der Zellkraft, verglichen mit shCtrl-Zellen, kommt. Bei einer untergeordneten Rolle von Hemidesmosomen bei der Kraftübertragung würden die zellulären Kräfte nur innerhalb des Aktinnetzwerkes übertragen und von diesem ausschließlich auf aktinassoziierte Adhäsionsstrukturen transduziert. Diese Strukturen, welche von der Plectinreduzierung unbeeinflusst sind und sowohl in shCtrl- als auch in shPlectin-Zellen weiterhin zelluläre Kräfte auf das Substrat übertragen, könnten die vergleichbaren Kräfte von shPlectin- und shCtrl-Zellen erklären.

Trotz der verlängerten Keratinverzweigungslänge [103] hatte die Herunterregulierung von Plectin keinen Einfluss auf die Elastizität dieser Zellen. Mittels kraftspektroskopischer Rasterkraftmikroskop-Messungen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zell-

elastizität zwischen shCtrl- und shPlectin-Zellen detektiert werden. Mögliche Gründe hierfür sind zytoskelettale Proteine wie Aktin, welche ebenfalls für die Zellelastizität verantwortlich sind, in den shPlectin-Zellen jedoch unbeeinflusst blieben. Zudem sind die mechanischen Veränderungen durch die Reduzierung von Plectin und die damit einhergehende veränderte Keratinverzweigungslänge, gegebenenfalls zu gering, als dass sie mit den hier verwendeten Messmethoden detektiert werden könnten. Obgleich es sich beim Rasterkraftmikroskop um ein sehr empfindliches Messgerät handelt, sind Indentationen oberhalb des Zellkerns von lebenden Zellen von vielen Faktoren und zytoskelettalen Bestandteilen beeinflusst. Eine große Streuung der Zellelastizität innerhalb der shCtrl- und shPlectin-Zellen erschwert deshalb die Detektion von kleinsten Veränderungen der Zellelastizität und macht die Analyse kleinster Veränderungen in vergleichenden Messungen von lebenden Zellen sehr schwierig. Desweiteren sind ausbleibende Auswirkungen der Plectinreduzierung auf die mechanischen Eigenschaften der Zellen möglicherweise dadurch zu erklären, dass zum Einen Plectin in den verwendeten Zellen nicht vollständig deletiert, sondern lediglich herunterreguliert wurde und zum Anderen, dass trotz Herunterregulierung von Plectin weitere Proteine der Plakin-Proteinfamilie exprimiert werden, welche ebenfalls die Organisation des Keratinnetzwerkes beeinflussen und dadurch möglicherweise kompensatorisch wirken. Zudem sind noch weitere Mechanismen und intrazelluläre Proteine, wie Epiplakin oder Periplakin bekannt, welche an der Organisation des Keratinnetzwerkes beteiligt sind und die Aufgaben des Plectin möglicherweise übernehmen, wodurch sie sein Fehlen eventuell kompensieren können [119] [120].

4.2 Auswirkungen der K14R131P-Mutation auf die Keratinnetzwerkorganisation sowie die Desmosomenlokalisation

Ein funktionelles Keratinnetzwerk ist Voraussetzung für den Aufbau einer funktionellen Haut. Modifikationen des Keratinnetzwerkes, ausgelöst durch Veränderungen wie der EBS-assoziierten Mutation R131P im Keratin 14, führen zu divergenten mechanischen Eigenschaften der Zellen und erhöhen ihre Fragilität. Eine detaillierte Analyse verschiedener genetischer Modifizierungen des Keratinnetzwerkes auf die mechanischen Eigenschaften der Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, um einen tieferen Einblick in krankhafte Veränderungen von Keratinozyten zu bekommen und so die Grundlage für mögliche Heilungsansätze zu schaffen. Hierfür wurden keratinfreie Keratinozyten

(KTyI/-) sowie Keratinozyten welche nur ein bestimmtes Keratin exprimieren (KTyI/-K14 und KTyI/-K14R131P), mit nicht mutierten Kontrollzellen (KTyIWT) verglichen. Die Deletion des gesamten Keratin-TypI-Genclusters ermöglichte die Generierung keratinfreier Keratinozyten und wurde, ebenso wie die Generierung der KTyI/-K14 - und KTyI/-K14R131P -Zellen, in der Arbeitsgruppe Magin durchgeführt.

Zunächst wurden die Auswirkungen der genetischen Veränderungen auf das Keratinnetzwerk der Zellen immunzytochemisch analysiert. Keratinfreie Keratinozyten wiesen hierbei ein schwaches, gleichmäßig verteiltes Keratinsignal im gesamten Zytoplasma auf, welches jedoch nur durch nachträgliche Anpassung der Bildhelligkeit sichtbar wurde. Grund hierfür ist, dass durch die Deletion des Keratin-TypI-Genclusters die Expression basischer Keratine in diesen Zellen zwar unbeeinflusst bleibt, diese aufgrund des fehlenden Bindungspartners jedoch keine Keratinfilamente aufbauen können [106], weshalb die basischen Keratine unmittelbar nach ihrer Translation degradiert werden. Anhand von translatierten aber noch nicht vollständig degradierten basischen Keratinen, lässt sich das schwache Hintergrundsignal der Fluoreszenzfärbung in diesen Zellen erklären.

Die Expression des sauren Keratin 14 in KTyI/- -Zellen führte zur Ausbildung eines normalen Keratinnetzwerkes, welches in Dichte, Lokalisation und Maschenweite mit dem Keratinnetzwerk von KTyIWT-Zellen vergleichbar war. Dies zeigt, dass die Expression des einzelnen sauren Keratin 14 für den Aufbau eines Keratinnetzwerkes ausreichend ist. In KTyI/-K14 -Zellen ist neben dem Keratinpaar K5/K14 aufgrund fehlender alternativer Bindungspartner auch die Bindung anderer basischer Keratine an Keratin 14 denkbar. Die Bindung alternativer Keratinfilamente wurde bereits für Keratin 15 beschrieben, welches in Abwesenheit von Keratin 14 überexprimiert wird und das Keratinpaar K5/K15 bildet, welches das Keratinpaar K5/K14 ersetzt [121]. Die Bindung von untypischen Keratinfilamenten trägt augenscheinlich dazu bei, dass die Expression eines sauren Keratins durch die Bindung verschiedener basischer Keratine bereits zur Ausbildung eines Keratinnetzwerkes, vergleichbar mit dem in Kontrollzellen, führt.

Die Expression des mutierten Keratin 14 in KTyI/-K14R131P-Zellen verhindert die Bildung eines intakten, den Zellkern umspannenden Keratinnetzwerkes [117]. Stattdessen kommt es in diesen Zellen zur Bildung von zytoplasmatischen Keratinaggregaten. Dies ist durch die Position der Mutation im Helixinitiationsmotif der Keratinfilamen-

te zu erklären, wodurch die Ausbildung funktioneller Keratindimere ausbleibt. Neben einer veränderten Organisation des Keratinnetzwerkes führte die K14R131P Mutation zudem zu einer modifizierten Lokalisierung desmosomaler Strukturen (siehe 3.2 auf Seite 76). Während für keratinfreie Typ-II-Keratinocyten eine Dislokalisierung desmosomaler Strukturen beschrieben wurde [122] und auch für KTyI/- -Zellen bestätigt werden konnte [117], konnte für KTyI/-K14R131P-Zellen in dieser Arbeit erstmals die Abhängigkeit der Dislokation desmosomaler Strukturen von zytoplasmatischen Keratinaagregaten gezeigt werden (siehe 3.2 auf Seite 76).

Im Vergleich zu anderen Veröffentlichungen [82] konnte jedoch keine Kolokalisation von Keratinaggregaten und Desmoplakin gemessen werden. Das Fehlen einer keratininduzierten Verankerung desmosomaler Strukturen könnte eine mögliche Ursache für die veränderte Lokalisation von Desmoplakin in KTyI/- und KTyI/-K14R131P-Zellen sein. Zudem wäre die veränderte Desmosomenlokalisierung eine mögliche Erklärung für die erhöhte Gewebefragilität bei EBS-Patienten [123].

4.3 Einfluss der K14R131P-Mutation auf die Zellelastizität

Es wurde bereits gezeigt, dass die Abwesenheit von Keratin zu einer signifikanten Reduzierung der Zellsteifigkeit von Keratinocyten führt [106] [99]. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die EBS-assoziierte Mutation K14R131P ebenfalls zu einer signifikanten Reduzierung der Zellsteifigkeit führt, was durch das Fehlen eines intakten Keratinnetzwerkes in diesen Zellen zu erklären ist. Während die Expression von Keratin 14 in KTyI/- -Zellen ausreicht, um ein Keratinnetzwerk auszubilden, welches mit dem von Kontrollzellen vergleichbar ist und auf Einzelzellebene ausreicht, um die mechanischen Eigenschaften der KTyIWT-Zellen wiederherzustellen, führt die Expression des mutierten Keratin 14 in KTyI/-K14R131P-Zellen nicht zur Ausbildung eines funktionellen Keratinnetzwerkes. Stattdessen sind zytoplasmatische Keratinaaggregate erkennbar, welche nicht in der Lage sind die mechanischen Eigenschaften der Kontroll-Keratinocyten wiederherzustellen.

Die Zellsteifigkeit ist in KTyI/-K14R131P-Zellen sogar noch stärker reduziert als in KTyI/- -Zellen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Assoziierung der Aggregatstruk-

turen mit Bestandteilen des Zytoskeletts. Während in keratinfreien Zellen in Abwesenheit eines Keratinnetzwerkes andere zytoskelettale Bestandteile weitestgehend unbeeinflusst bleiben, könnte die Ausbildung von Keratinaggregaten in KTyI/-K14R131P-Zellen durch die Bindung zytoskelettaler Komponenten, wie Adapterproteinen, zu einer Veränderung des Zytoskeletts und dadurch zur Veränderung der mechanischen Eigenschaften dieser Zellen führen. Mögliche Bindepartner sind auch desmosomale oder hemidesmosomale Proteine deren Assoziierung mit Keratinaagregaten bereits beschrieben wurde. Die Bildung von Keratinaggregaten in KTyI/-K14R131P-Zellen führt aufgrund des fehlenden Netzwerkes nicht nur zu einer schwächeren Verankerung von Desmosomen und Hemidesmosomen, sondern durch Bindung an desmosomale Proteine auch zu einer aktiven Dislokation dieser Proteine ins Zytoplasma. Dadurch fehlen diese, oder auch andere Adapterproteine in ihrer eigentlichen Funktion, was die Zytoskelettorganisation und Zellsteifigkeit beeinflussen könnte. Verglichen mit keratinfreien Zellen könnte dies eventuell zu einer stärkeren Reduzierung der Zellsteifigkeit führen.

Rasterkraftmikroskopmessungen an konfluenten Zellschichten unter Kalziumeinfluss bestätigen die zuvor an Einzelzellen gemessenen Ergebnisse der Zellsteifigkeiten verschiedener Keratinozyten-Zelllinien nicht nur, sondern zeigen signifikant stärkere Auswirkungen verschiedener Keratinnetzwerke auf die Zellelastizität. Dieser verstärkte Effekt, welcher mit der Erhöhung der Zellsteifigkeit in allen untersuchten Zelltypen einhergeht, ist auf die Ausbildung kalziumabhängiger Adhärenzverbindungen zurückzuführen. Der Vergleich von KTyI/- und KTyI/-K14-Zellen zeigt, dass nicht nur die Ausbildung von Desmosomen, welche in beiden Zellen möglich ist, sondern auch die Verankerung dieser Strukturen durch ein funktionelles Keratinnetzwerk für die Erhöhung der Steifigkeit notwendig ist, wie sie nur in KTyI/-K14-Zellen gegeben ist. Während KTyI/--Einzelzellen eine höhere Zellsteifigkeit aufwiesen als KTyI/-K14R31P-Zellen unterscheiden sich die Elastizitäten dieser Zellen unter Kalziumeinfluss in konfluenten Zellschichten nicht länger voneinander. Die fehlende Verknüpfung eines intakten Keratinnetzwerkes in desmosomale Strukturen ist in beiden Zelltypen Grund für eine signifikant niedrigere Zellsteifigkeit verglichen mit KTyIWT-Zellen. KTyI/-K14-Zellen, welche auf Einzelzellebene noch die annähernde Steifigkeit der Kontrollzellen wiederherstellen konnten, erreichen als konfluente Zellschicht unter Kalziumeinfluss lediglich 65% der Steifigkeit von Kontrollzellen. Die Expression eines sauren Keratins in KTyI/-Zellen reicht folglich nicht aus, um in einer konfluenten Zellschicht die mechanischen Eigenschaften von KTyIWT-Zellen wiederherzustellen. Dies zeigt, dass für die Ausbildung einer funktionellen Zellschicht augenscheinlich

die Expression mehrerer verschiedener Keratine notwendig ist und beweist, dass die große Vielzahl an verschiedenen Keratinen nicht nur eine kompensatorische Absicherungsfunktion hat. Möglicherweise spielt die genaue Zusammensetzung der Keratinfilamente bei der Kopplung von Desmosomen und Hemidesmosomen eine wichtige Rolle. Im Vergleich zu Einzelzellen sind diese kalziumabhängigen Strukturen für die mechanischen Eigenschaften von konfluenten Zellschichten von großer Bedeutung. Die veränderte Keratinfilamentzusammensetzung wirkt sich deshalb, aufgrund der Beeinflussung von desmosomalen Strukturen, eventuell in Zellschichten stärker auf die mechanischen Zelleigenschaften aus, als auf Einzelzellebene.

4.4 Einfluss veränderter Keratinnetzwerke auf die Integrität von Zellschichten

Die veränderten mechanischen Eigenschaften sowie die modifizierte Desmosomenlokalisation in KTyI/-K14R131P-Zellen sind mögliche Gründe für eine erhöhte Fragilität dieser Zellen, wie sie häufig im Zusammenhang mit Epidermolysis bullosa simplex beschrieben wird. Aus diesem Grund wurde die Integrität von KTyI/-K14R131P-Zellschichten sowie von KTyI/-, KTyI/-K14- und KTyIWT-Zellschichten unter Kalziumeinfluss analysiert. Die uniaxiale Dehnung aller Zellen bewirkte in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten keine Veränderungen des Keratinnetzwerkes. Alle vier Zelltypen waren nach 90-minütiger zyklischer Dehnung (14%, 4 Hz) adhärent, aufgespannt und zeigten keinerlei Veränderungen des Keratinnetzwerkes im Vergleich zu vorher, wie auch von Fudge et al. 2008 und Beriault et al. 2012 beschrieben [79] [80]. Das Aktinnetzwerk aller Zelltypen war nahezu senkrecht zur Zugrichtung orientiert, was für ein unbeeinflusstes Verhalten der Mikrofilamente spricht. Risse oder vergrößerte Abstände zwischen den einzelnen Zellen waren nicht erkennbar, was auch nach 90 minütiger Dehnung auf intakte Zell-Zell-Kontakte in allen Zelltypen schließen lässt.

Eine Dehnungsamplitude von 14% wurde gewählt, da sie mit physiologischen Dehnungen der Haut von 30-40% vergleichbar ist [124] [125]. Zwar fällt die in dieser Arbeit angelegte Dehnungsamplitude etwas geringer aus, ist jedoch bereits ausreichend, um eine starke Reorientierung des Aktinnetzwerkes hervorzurufen. Da die zyklische Dehnung von konfluenten Zellschichten um 14% für 90 Minuten in dieser Arbeit jedoch augenscheinlich keinen

Einfluss auf die Organisation des Keratinnetzwerkes hatte, wurden die Zellen zusätzlich um 40% gedehnt. Dies entspricht der Größenordnung von physiologischen Dehnungen der Haut, führte allerdings ebenfalls zu keinen sichtbaren morphologischen Veränderungen der Zellen.

Die in dieser Arbeit beschriebene Keratin 14R131P-Mutation ist Auslöser der EBS-assoziierten Veränderungen im murinen Keratin 14, während sich beim Menschen die gleiche EBS-assoziierte Mutation an der Stelle 125 des humanen Keratin 14 befindet. In der Literatur wird deshalb häufig die Expression des mutierten, humanen Keratin 14R125 beschrieben. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Generierung keratinfreier Keratinozyten wird zudem meist die Expression von K14R125 in nicht mutierten Kontrollzellen untersucht. Durch zahlreiche intakte Keratine kommt es in diesen Zellen zur Ausbildung eines funktionellen Keratinnetzwerkes. Dieser kompensatorische Effekt entfällt bei der Expression von K14R131P in keratinfreien Zellen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, sodass es in diesen Zellen nicht zur Ausbildung eines Keratinnetzwerkes, sondern zur Bildung zytoplasmatischer Keratinaggregate kommt.

Die Abwesenheit eines Keratinnetzwerkes in KTyI-/K14R131P-Zellen deutet darauf hin, dass das Keratin 14R131P aufgrund der Mutation im Helix-Initiierungsmotiv nicht in der Lage ist, ein Keratinnetzwerk aufzubauen. Die Ausbildung eines Keratinnetzwerkes in Kontrollzellen, welche Keratin 14R125 exprimieren, kommt augenscheinlich nur aufgrund des kompensatorischen Effektes anderer Keratine zustande, welche die Funktion des mutierten Keratin 14 beim Aufbau eines Netzwerkes übernehmen. Ein direkter Vergleich der Auswirkungen mechanischer Reize auf KTyI-/K14R131P-Zellen und Kontrollzellen, welche K14R125 exprimieren, ist deshalb nicht möglich. Dennoch sind auch Experimente an K14R125-Zellen beschrieben, welche -wie in dieser Arbeit gezeigt- keine Auswirkungen von zyklischer Dehnung auf das Keratinnetzwerk zeigen. So wurde für langsame (13 mHz) uniaxiale Dehnungen von K14R125-Zellen kein Unterschied des Keratinnetzwerkes im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt [80]. Es sind jedoch auch Experimente bekannt, welche die erhöhte Fragilität und die veränderten mechanischen Eigenschaften des mutierten Keratins 14 beschreiben. Russell und Kollegen beispielsweise konnte zeigen, dass eine schnelle (4 Hz), radiale Dehnung von Keratinozyten mit EBS-Mutation zum Zusammenbruch des Keratinnetzwerkes führt.

Beriault gab als Grund für diesen konträren Effekt zu seinen Experimenten die unterschiedliche Geschwindigkeit der Dehnungen an. In dieser Arbeit wurde die uniaxiale Dehnung (wie in [80] beschrieben) mit hohen Frequenzen von 4 Hz (wie sie in [82] angegeben wurden) kombiniert. Das Ergebnis zeigte für alle Zelltypen ein unverändertes Keratinnetzwerk, senkrecht zur Zugrichtung orientierte Aktinfasern sowie intakte Zell-Zell-Adhäsionen und falsifiziert somit die von Beriault aufgestellte Hypothese. Grund für die unterschiedlichen Reaktionen scheint nicht die Frequenz, sondern vielmehr die Dehnungsrichtung (uniaxial oder radial) zu sein. Im Gegensatz zur uniaxialen Dehnung, bei welcher sich das Aktinnetzwerk senkrecht zur Zugrichtung ausrichtet und dicke Stressfasern bildet, wird das Aktinnetzwerk bei der radialen Dehnung vollständig zerstört und kann unter anhaltender Dehnung nicht wieder aufgebaut werden.

Eine weitere Möglichkeit für die unterschiedlichen Reaktionen des Netzwerkes auf uniaxiale und radiale Dehnung wäre, dass der Verlust des Aktinnetzwerkes bei radialer Dehnung zu höheren Belastungen des Keratinnetzwerkes führt, welchen das K14R125-Netzwerk nicht länger standhalten kann. Hierbei wäre es denkbar, dass die Abwesenheit eines Aktinnetzwerkes zu veränderten mechanischen Eigenschaften der Zellen sowie zum Verlust aktinassoziierter Adhärenzverbindungen führt, wodurch unter Dehnung eine höhere Belastung auf keratinvermittelte Adhärenzverbindungen wirkt, welche in K14R125-Zellen zum Zusammenbruch des Netzwerkes führen. Ähnliche Auswirkungen könnte die radiale Dehnung auch auf das Keratinnetzwerk in K14R125-Zellen haben. Zudem ist in Abwesenheit eines Aktinnetzwerkes die aktinabhängige Translokation von Keratinfilamenten gestört. Diese ist für den Aufbau sowie für Umstrukturierungen des Keratinnetzwerkes jedoch von essentieller Bedeutung, da bislang keine keratinassozierten Motorproteine bekannt sind. Die Eliminierung des Aktinnetzwerkes durch radiale Dehnung könnte somit einen indirekten Effekt auf die Organisation des Keratinnetzwerkes haben. Umstrukturierungen des Keratinnetzwerkes infolge externer Reize durch zyklische Dehnung wären in Zellen ohne Aktinnetzwerk nicht möglich, was gegebenenfalls die erhöhte Fragilität dieses Netzwerkes bei radialer Dehnung erklärt. Möglich wäre auch, dass die radiale Dehnung zu einer stärkeren Belastung der Keratinfilamente führt, welcher die Filamente unter radialer Dehnung nicht entkommen können, während die uniaxiale Dehnung eine geringe Belastung für die Keratinfilamente darstellt, welche sie durch longitudinale Elongation reduzieren können.

Zusammenfassend haben die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen gezeigt, dass

Veränderungen des Keratinnetzwerkes einen entscheidenden Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften von Keratinozyten haben. Die Expression des mutierten Keratin 14R131P in KTyI/- Zellen beeinträchtigt die Zellelastizität stärker als die vollständige Abwesenheit eines Keratinnetzwerkes und auch die Expression eines der wichtigsten epidermalen Keratine, des Keratin 14 in KTyI/- Zellen reichte nicht aus, um ein voll funktionsfähiges Keratinnetzwerk mit vergleichbaren mechanischen Eigenschaften der Kontrollzellen wiederherzustellen. Die Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration führte jedoch in allen Zelltypen zur Ausbildung einer stabilen Zellschicht, deren mechanische Stabilität und Integrität ausreichend waren, um die in dieser Arbeit angelegten externen Reize augenscheinlich unbeschadet zu überstehen.

4.5 Lokalisation von Aktinfilamenten und Adhäsionsstrukturen in Abhängigkeit von Kalzium

Die Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration führt zur epidermalen Differenzierung von Keratinozyten und geht *in vivo* und *in vitro* mit einer Umstrukturierung des Zytoskeletts einher [7] [126]. Wie bereits zuvor beschrieben, führte die Zugabe von Kalzium zu einer Translokation des Vinculinsignals, welches sich von zentralen, gleichmäßig verteilten Fokaladhäsionen hin zu peripheren Fokaladhäsionen verschob und 6 Stunden nach Kalziumzugabe vornehmlich in der apikalen Ebene der Zelle erkennbar war. Diese kalziuminduzierte Umverteilung von Vinculin wurde ausschließlich in konfluenten Zellschichten und nicht im peripheren Bereich von Zellgruppen beobachtet [127], was dafür spricht, dass die Umverteilung auf die Ausbildung kalziumabhängiger Zell-Zell-Adhäsionen zurückzuführen ist. Kalziumabhängige Adherens Junctions sind in der apikalen bzw. ventralen Ebene der Zellen lokalisiert, was die Reduzierung des Vinculinsignals in der basalen Ebene sowie die Verstärkung des Signals in der apikalen Ebene nach sechsständiger Kalziuminkubation erklärt [128] [129]. Die Formierung der kalziumabhängigen Adhäsionsstrukturen ist sechs bis zwölf Stunden nach Kalziumzugabe weitestgehend abgeschlossen [130] [127] [131], was mit der Lokalisation des zuvor beschriebenen Vinculinsignals in der apikalen Ebene zu diesem Zeitpunkt übereinstimmt.

Bislang ist nicht vollständig geklärt, ob die Affinität der Adherens Junctions-Vinculinbindestellen stärker als die der Vinculinbindestellen in Fokaladhäsionen ist, oder

ob es zu einer Umverteilung des Vinculinsignals aufgrund einer Freisetzung von Vinculin aus Fokaladhäsionen kommt [132]. Letzteres wird durch Beobachtungen gestärkt, welche eine Herunterregulierung von Integrinen während der epidermalen Differenzierung beschreiben, was mit der Reduzierung von Fokaladhäsionen einhergeht [133]. Die Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, wodurch es zur Aktivierung von Phosphorylierungskaskaden kommt, welche ebenfalls an der Translokation von Vinculin beteiligt sein könnten [132].

Neben der Translokation von Vinculin führt die Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration auch zu einer Umstrukturierung des Aktinnetzwerkes. Wie in Magee et al. 1987 beschrieben, verändert sich die Aktinverteilung von ungeordnet in der Zelle verteilten Aktinbündeln, welche mit Fokaladhäsionen assoziiert sind, hin zu peripheren Aktinbündeln, welche den zentralen Bereich der Zellen größtenteils aussparen [134] [127]. Die periphere Anordnung der Aktinfasern fällt in vinculinfreien Zellen und in Zellen mit reduzierten Zell-Zell-Adhäsionen deutlich schwächer aus als in Kontrollzellen und ist vermutlich auf die Ausbildung von kalziumabhängigen Adhäsionsstrukturen zurückzuführen. Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, dass die periphere Anordnung der Aktinfasern auch in konfluenten Zellschichten nur in Anwesenheit von Kalzium stattfindet. Beeinflusst wird die Aktinorganisation durch die Lokalisation von Vinculin in Adherens Junctions, welches als wichtiger Aktinbindepartner zu einer Verankerung und Bündelung von Aktinfasern in diesen Strukturen und zu einer Rekrutierung neuer Filamente führt [135] [136] [137]. Zusätzlich wird die Lokalisierung und Bündelung von Aktinfilamenten an diesen Strukturen durch die vinculininduzierte Rekrutierung weiterer Aktinregulatoren wie Arp2/3 oder VASP an Adherens Junctions eventuell weiter verstärkt [138]. Die kalziuminduzierte Ausbildung von Adherens Junctions erklärt die unter 3.4 auf Seite 91 beschriebenen Beobachtungen der kalziumabhängigen Umstrukturierung des Zytoskeletts und ist Voraussetzung für die veränderten mechanischen Eigenschaften der Zellen.

4.6 Veränderung der Aktinfaserreorientierung durch Einfluss von Kalzium

Die zyklische Dehnung von Keratinozyten führte, wie bereits für andere Zellen beschrieben [89] [84], zur Reorientierung der Aktinfasern annähernd senkrecht zur Zugrichtung. Wie

in 3.5 auf Seite 96 gezeigt, wird die Aktinfaserreorientierung unter Kalziumeinfluss signifikant begünstigt. Dieser Effekt ist bei Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration bei Einzelzellen nicht zu beobachten und auch die bloße Anwesenheit von Nachbarzellen reicht in konfluenten Zellschichten in Abwesenheit von Kalzium nicht aus, um die Reorientierung von Aktinfasern zu verstärken. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die signifikante Verstärkung der Aktinfaserreorientierung in konfluenten Zellschichten unter Kalziumeinfluss auf die Ausbildung von kalziuminduzierten Zell-Zell-Adhäsionen zurückzuführen ist.

Weitere Versuche an Zellen mit veränderten Adhäsionsstrukturen bestätigten diese Beobachtungen (siehe 3.12 auf Seite 112). Vinculinfreie Zellen zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen eine reduzierte Aktinfaserreorientierung, näherten sich durch Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration in konfluenten Zellschichten jedoch der Aktinfaserorientierung der Kontrollzellen deutlich an. Dies zeigt, dass die fokaladhäsionsvermittelte Reorientierung dieser Zellen in Abwesenheit von Vinculin signifikant reduziert ist, diese Zellen die Reduzierung über einen kalziumvermittelten, zweiten mechanosensitiven Mechanismus jedoch augenscheinlich teilweise kompensieren können. Dieser Mechanismus der Reorientierung ist weniger stark von Vinculin abhängig, als der fokaladhäsionsvermittelte Mechanismus, was durch die signifikante Erhöhung der Aktinfaserreorientierung durch Zugabe von Kalzium bei konfluenten Zellschichten, sowohl bei VincCtrl- als auch bei VincKO-Zellen deutlich wird.

Voraussetzung für einen mechanosensitiven Mechanismus sind mechanosensitive Strukturen. Bei aktinassozierten Adhärenzverbindungen stehen hierbei vor allem die Proteine α -Catenin und Vinculin im Fokus [64] [139], aber auch E-Cadherin [140] und β -Catenin [141] [142] werden als mechanosensitive Moleküle beschrieben. Die Mechanosensitivität von Adhärenz Junctions wurde aufgrund der MyosinII gesteuerten Spannungsabhängigkeit dieser Verbindungen entdeckt [143] [144] [145]. Auch die Lokalisation von Vinculin in Adhärenz Junctions ist myosin- und somit spannungsabhängig [140] [40]. Vinculin hat in Fokaladhäsionen und Adhärenz Junctions ähnliche Funktionen und bindet in beiden Strukturen Aktinfasern sowie Aktinregulatoren. Wie in 3.6 auf Seite 97 beschrieben, übersteigt die kalziumabhängige Rekrutierung von Vinculin an Adhärenz Junctions die dehnungsinduzierte Erhöhung der Vinculinlokalisation in Fokaladhäsionen [53] [146]. Grund hierfür könnte zum einen die kalziuminduzierte Reduzierung der Größe und Anzahl von Integrinstrukturen sein, zum anderen die Mechanosensitivität von α -Catenin, welches unter Deh-

nung Vinculinbindestellen freigibt [64]. Hinzu kommt, dass die Bindung von α -Catenin an die Kopfdomäne von Vinculin, die c-terminale Bindung von Vinculin zu F-Aktin verstärkt [59].

Die beschleunigte Reorientierung der Aktinfasern in Zellschichten unter Kalziumeinfluss ist durch die Ausbildung kalziumabhängiger Adhäsionsstrukturen zu erklären, welche dazu führt, dass in diesen Zellen neben Fokaladhäsionen eine weitere mechanosensitive Struktur für die Bindung von Aktinfilamenten zur Verfügung steht. Diese zusätzliche Adhäsionsstruktur kann externe Reize wahrnehmen und weiterleiten, wodurch es zu einer erhöhten Mechanosensitivität und verstärkten Umstrukturierung des Zytoskeletts in diesen Zellen kommt. Desweiteren führt die Ausbildung von Zell-Zell-Adhäsionen zu einer Erhöhung der Anzahl von Aktinadhäsionsstrukturen, was die Verankerung neu gebildeter Aktinfasern sowie die Umorientierung bereits bestehender Fasern unter Dehnung begünstigen könnte. Gleichzeitig sind an der Ausbildung von Adherens Junctions mehrere mechanosensitive Proteine beteiligt, welche unter Dehnung zahlreiche Bindestellen freigeben. An diese können Proteine binden, welche unter Dehnung ebenfalls weitere Bindestellen freigeben, wodurch es unter Dehnung zu einer Potenzierung der Aktinbindekapazitäten in diesen Zellen kommt.

Zusätzlich wird die Aktinfaserreorientierung in Zellschichten unter Kalziumeinfluss vermutlich durch kollektives Zellverhalten beschleunigt. In Zellschichten mit Zell-Zell-Adhäsionen führt das intrazelluläre Zerreißen von Aktinfasern durch Dehnung zur unmittelbaren Reduzierung der Spannung am Zell-Zell-Kontakt, wodurch es auch zu einer Spannungsreduzierung auf der anderen Seite des Zell-Zell-Kontaktes, in der benachbarten Zelle, kommt. Dies könnte dazu führen, dass α -Catenin auch hier nicht länger in aufgespannter Konformation vorliegt, was dazu führt, dass Vinculin nicht länger an den Zell-Zell-Kontakt binden kann und dadurch auch die Bindung von Aktinfasern deutlich reduziert würde. Im Gegensatz dazu führt das kollektive Zellverhalten bei Aktinfasern, welche aufgrund ihrer Orientierung innerhalb der Zelle bei uniaxialen Dehnungen nicht zerreißen, zu einer Verstärkung der von ihnen auf die Zell-Zell-Adhäsion ausgeübte Kraft. Dies führt zu einer Verstärkung der Adhäsionsstruktur und überträgt sich auch auf die Adhäsionsstruktur in benachbarten Zellen, was in Zellschichten aufgrund dieses kollektiven Zellverhaltens zu einer beschleunigten Aktinfaserreorientierung führen könnte.

4.7 Veränderung der maximalen Aktinfaserausrichtung infolge der Ausbildung von kalziumabhängigen Adhärenzverbindungen

Beim direkten Vergleich von Zellschichten unter zyklischer Dehnung in Ab- und Anwesenheit von Kalzium wird deutlich, dass die Zugabe von Kalzium die Aktinfaserreorientierung nicht nur beschleunigt, sondern die maximale Ausrichtung der Filamente signifikant erhöht. Dies ist damit zu erklären, dass sich Aktinfasern unter zyklischer Dehnung so ausrichten, dass sie möglichst wenig Dehnung erfahren [84]. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zugkammern liegt die geringste Belastung für Aktinfilamente bei uniaxialen Dehnung von 14%, aufgrund der Längenänderung und Stauchung der Zugkammer, bei einer Orientierung von 70° (im Verhältnis zur Zugrichtung) [84]. Die bevorzugte Orientierung der Aktinfasern nach zyklischer Dehnung liegt für Zellen in Abwesenheit von Kalzium deshalb bei etwa $+70^\circ$ bzw. -70° .

Die kalziuminduzierte Ausbildung von Adhärenzstrukturen verschiebt die Winkelverteilung der Aktinfasern in konfluenten Zellschichten zu höheren Werten um 90° und erhöht somit die maximale Ausrichtung der Aktinfasern dieser Zellen. Grund hierfür ist möglicherweise, dass durch die Ausbildung von Adherens Junctions Strukturen entstehen, welche die Aktinnetzwerke benachbarter Zellen verbinden. Aufgrund der Lokalisation der Adherens Junctions ist die Ausrichtung der Aktinfasern beeinflusst, wodurch Fasern, welche in der gleichen Adhäsionsstruktur verankert sind, häufig die gleiche Orientierung aufweisen. Während es bei einzeln liegenden Zellen vernachlässigbar ist, ob sie eine Aktinfaserorientierung von $+70^\circ$ oder -70° annehmen, werden Aktinfasern in Zellen unter Kalziumeinfluss über Adherens Junctions von der Aktinfaserorientierung ihrer Nachbarzelle beeinflusst. Um hohe Spannungen an Adhärenzstrukturen zwischen Zellen mit Aktinfaserorientierungen von $+70^\circ$ und -70° zu minimieren, kommt es deshalb in diesen Zellen augenscheinlich zu einer energetisch günstigeren Umlagerung der Aktinfilamente. Da dies jedoch nicht dazu führt, dass die Aktinfasern der gesamten Zellschicht eine Vorzugsorientierung von 70° aufweisen, bei welcher einzelne Fasern die geringste Belastung erfahren würden, spielen offensichtlich weitere Faktoren bei der Aktinfaserreorientierung in konfluneten Zellschichten eine Rolle.

Ein möglicher Grund könnte die Quervernetzung von Aktinfilamenten sein, die dazu

führt, dass sich die Fasern nicht länger als individuelle Einheit, sondern wie ein Verband verhalten. Die Ausrichtung im 70° Winkel zur Zugrichtung führt lediglich bei einzelnen, linienförmigen Strukturen zur Minimierung der relativen Dehnung. Bei komplexen Strukturen, wie Zellschichten steht deshalb eventuell die Minimierung der mechanischen Spannung im Fokus, welche durch Ausrichtung der Aktinfasern im 90° Winkel zur Zugrichtung erreicht würde. In dieser Arbeit wurde erstmals neben dem bekannten fokalladhäsionsvermittelten mechanosensitiven Mechanismus ein weiterer kalziumabhängiger Mechanismus für die Reorientierung von Aktinfasern nach zyklischer Dehnung beschrieben. Die Untersuchungen verschiedener Adhäsionsmutanten verdeutlichen, dass es sich bei diesem zweiten Mechanismus um mechanosensitive Adherens Junctions handelt, welche entscheidend an der Reorientierung von Aktinfasern beteiligt sind und die maximale Ausrichtung dieser Filamente signifikant verstärken können. Im Vergleich zur fokalladhäsionsvermittelten Reorientierung steht bei der adherens junction-vermittelten Aktinfaserreorientierung nicht das mechanosensitive Protein Vinculin, sondern das ebenfalls mechanosensitive Protein α -Catenin im Fokus. Dieses scheint für die adherens junction-vermittelte Reorientierung von größerer Bedeutung zu sein als Vinculin, da es auch in Abwesenheit von Vinculin unter Kalziumeinfluss zu einer verstärkten Ausrichtung der Aktinfasern kommt.

Der genaue Signalweg des adherens junction-vermittelten Mechanismus ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt, es wird jedoch vermutet, dass aufgrund der großen Ähnlichkeit von Adherens Junctions und Fokalladhäsionen bei diesem Mechanismus ebenfalls eine Aktivierung von Rho-Proteinen über RhoA zu einer Regulierung von Myosin und dadurch zur Regulierung intrazellulärer Kräfte führt [147] [148]. Trotz der großen Ähnlichkeiten zwischen den beiden Strukturen erfolgt eine spezifische Steuerung der Mechanismen. Diese individuelle Regulierung erfolgt über spezifische Phosphorylierungen wie beispielsweise die Phosphorylierung von Vinculin an der Position Y822 [149], welche spezifisch für Adherens Junctions ist und nicht in Fokalladhäsionen vorkommt. Diese Phosphorylierung wird durch Tyrosinkinasen vermittelt, welche durch Kraftübertragung an Cadherinen – jedoch nicht an Integrinen – aktiviert werden [149].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten nicht nur einen weiteren mechanosensitiven Mechanismus identifizieren, welcher an der Aktinfaserreorientierung nach zyklischer Dehnung beteiligt ist, sondern zeigen auch, von welcher enormen Bedeutung die Anpassung an physiologische Bedingungen für Experimenten an lebenden Zellen ist.

Erst durch die Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration und der dadurch ausgelösten epidermalen Differenzierung konnte der adherens junction-vermittelte Mechanismus der Aktinfaserreorientierung entdeckt werden, was an artifiziellen Einzelzelluntersuchungen niemals möglich gewesen wäre. Dies zeigt, wie wichtig es ist, die Bedingungen *in vitro* bestmöglich an die Gegebenheiten *in vivo* anzupassen.

Desweiteren wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen mutierter Keratinnetze auf die mechanischen Eigenschaften von Zellen untersucht, um ein tieferes Verständnis epithelialer Krankheiten zu erlangen. Hierbei konnten auf zellulärer Ebene Unterschiede im Nanopascal-Bereich zwischen den verschiedenen Genotypen aufgezeigt und so modifizierte mechanische Eigenschaften der Zellen durch veränderte Keratinnetze nachgewiesen werden. Diese Analysen belegen die enorme Bedeutung eines funktionellen Keratinnetzes für die mechanischen Zelleigenschaften.

Neben Zellen mit verändertem Keratinnetzwerk erlaubt die Generierung von Zellen mit verschiedensten genetischen Hintergründen eine präzise Untersuchung des Einflusses einzelner (zellulärer) Komponenten auf die mechanischen Eigenschaften von Zellen und ermöglicht so ein immer tieferes Verständnis für das komplexe Zusammenspiel der zahlreichen zellulären Bestandteile. Da aufgrund der hohen Komplexität von Organismen *in vivo* Analysen mechanischer Zelleigenschaften mit den heutigen Messmethoden kaum möglich sind, bieten mechanobiologische Untersuchungen *in vitro* eine ideale Möglichkeit für die Analysen von Zelleigenschaften. Diese Analysen sind eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis zellulärer Prozesse und ermöglichen es Krankheiten detailliert zu erforschen und Heilungsansätze zu generieren.

5 Ausblick

Da bei den in dieser Arbeit durchgeführten Dehnungsexperimenten an VincKO-Zellen auch für höhere Frequenzen (600 mHz) und längere Dehnungszeiten (16 Stunden) kein Endpunkt der maximalen Aktinfaserausrichtung erreicht werden konnte, ist die Wiederholung dieses Experiments mit längeren Dehnungsdauern von voraussichtlich bis zu 20 Stunden notwendig, um eine Aussage über die maximale Aktinfaserausrichtung in VincKO-Zellen in Ab- und Anwesenheit von Kalzium treffen zu können. Nur so kann überprüft werden, ob die Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration auch in vinculinfreien Zellen über eine adherens junction-vermittelten Mechanismus zu einer Aktinfaserreorientierung führt, welche mit der in VincCtrl-Zellen vergleichbar ist.

Gleichzeitig sind Dehnungsexperimente an VincKO-Zellen, in welchen α -Catenin herunterreguliert wurde, erforderlich, um zu zeigen, dass die Erhöhung der Aktinfaserreorientierung in VincKO-Zellen unter Kalziumeinfluss auf die Ausbildung mechanosensitiver Adhärenzverbindungen und nicht auf die Reduzierung von Fokaladhäsionen zurückzuführen ist. Mittels Fusion von siRNA gegen α -Catenin in VincKO-Zellen kann der α -Cateningehalt in diesen Zellen, wie bereits zuvor für ECadCtrl-Zellen gezeigt, herunterreguliert werden. Anhand von Dehnungsexperimenten an VincKO α CatKD-Einzelzellen sowie konfluenten Zellschichten könnte anschließend durch eine verminderte Aktinfaserreorientierung in VincKO α CatKD-Zellen die Existenz eines α -Catenin-abhängigen, mechanosensitiven Mechanismus zur Aktinfaserreorientierung bestätigt werden.

Ebenfalls interessant ist die Analyse der Aktinfaserreorientierung in Zellen, welchen nicht Vinculin sondern ein anderes mechanosensitives Fokaladhäsionsprotein wie beispielsweise p130Cas fehlt, welches für Fokaladhäsionen, aber nicht für Adherens Junctions von Bedeutung ist. In dieser Arbeit konnte bereits die Bedeutung von Vinculin für die Aktinfaserreorientierung aufgezeigt sowie eine beschleunigte Faserreorientierung durch die Ausbildung kalziuminduzierter Adherens Junctions nachgewiesen werden. Eine Analyse der Relevanz von Fokaladhäsionen in Zellen mit unbeeinflussten Adhärenzverbindungen steht bislang noch aus. Anhand von Dehnungsexperimenten von p130Cas-freien Zellen kann die Bedeutung mechanosensitiver Strukturen in Fokaladhäsionen für die Aktinfaserreorientierung adhäsionsspezifisch untersucht und mit der Aktinfaserausrichtung in vinculinfreien Zellen verglichen werden.

Zudem ist eine detaillierte Untersuchung der Auswirkungen zyklischer Dehnungen auf die Translokation bestimmter, am Reorientierungsprozess beteiligter Proteine für die Aufklärung des genauen Mechanismus der Aktinfaserreorientierung notwendig. Hierzu zählt auch die Analyse der Lokalisationsveränderung verschiedener Adhäsionsproteine unter Kalziumeinfluss. In der vorliegenden Arbeit wurde bereits gezeigt, dass es in VincCtrl-Zellen unter Kalziumeinfluss zu einer Translokation von Vinculin kommt, welche auf die Ausbildung von kalziumabhängigen Adhärenzverbindungen zurückzuführen ist. Diese Translokation wurde in Zellen mit veränderten Zell-Zell-Adhäsionen bislang nicht untersucht, wird jedoch Aufschluss über den Grund der veränderten mechanischen Eigenschaften dieser Zellen liefern und kann mittels der in dieser Arbeit verwendeten Zellen durchgeführt werden. Auch die Veränderung der Lokalisation von Fokaladhäsionsproteinen infolge zyklischer Dehnung wurde bislang nur in VincCtrl-Zellen untersucht. Eine Analyse der Lokalisationsveränderung in Zellen mit veränderten Fokaladhäsions- oder Adhärenzstrukturen könnte Aufschluss über die Bedeutung verschiedener Proteine für die Integrität von Zellschichten sowie die Aktinfaserreorientierung bringen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Dehnungsexperimente an Keratinozyten mit veränderten Keratinnetzwerken zeigten in Immunfluoreszenzaufnahmen nach 90-minütiger zyklischer Dehnung keine Veränderung des Keratinnetzwerkes. Da jedoch nachgewiesen wurde, dass sich die mechanischen Eigenschaften der untersuchten Keratinozyten signifikant voneinander unterscheiden und in der Literatur für Zellen mit veränderten Keratinnetzwerken eine erhöhte Fragilität beschrieben wurde [82], wurden neben immunzytochemischen Färbungen auch Genexpressionsanalysen von KTYIWT- und KTYI/- -Zellen nach zyklischer Dehnung vorgenommen. Diese wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Magin und der Arbeitsgruppe Hatzfeld (Division for Pathobiochemistry, Halle) durchgeführt und konnten für mehr als 600 Gene der KTYIWT-Zellen eine erhöhte Genexpression infolge zyklischer Dehnung nachweisen. Zusätzlich zeigte der Vergleich der Genregulation von KTYIWT- und KTYI/- -Zellen, dass mehr als 40% der in KTYIWT-Zellen durch Dehnung hochregulierten Gene in KTYI/- -Zellen bereits ohne Dehnung hochreguliert sind. Die Abwesenheit eines Keratinnetzwerkes in KTYI/- -Zellen löst demzufolge eine Veränderung der Genexpression aus, welche in KTYIWT-Zellen erst durch zyklische Dehnung hervorgerufen wird. Für eine detaillierte Interpretation der veränderten Genregulation bedarf es jedoch einer genaueren Untersuchung der Genexpressionsanalysen. Hierbei wäre für zukünftige Experimente neben dem Vergleich des Grundzustandes der Genexpression in Zellen mit verschiedenen genetischen Hintergründen auch die

Analyse der Auswirkungen zyklischer Dehnung auf die Genexpression in verschiedenen Zellen von großem Interesse. Zusätzlich können Genexpressionsanalysen von Zellen mit veränderten Adhäsionsstrukturen Informationen über bestimmte Signalwege liefern, denn bereits jetzt ist bekannt, dass kalziuminduzierte Adherens Junctions die mechanischen Eigenschaften der Zellen verändern und entscheidend für die Aktinfaserreorientierung sind. Die Genexpressionsanalysen verschiedener Zellen ermöglicht die simultane Untersuchung zahlreicher Gene, was durch weitere Experimente die Aufklärung spezifischer Signalwege sowie die Untersuchung mutationsabhängiger Veränderungen der mechanischen Eigenschaften von Zellen erlaubt.

Neben zusätzlichen Dehnungsexperimenten sind auch weitere Rasterkraftmikroskop-Messungen an Zellen mit verschiedenen genetischen Hintergründen von großem Interesse. Während in dieser Arbeit bereits gezeigt wurde, dass die Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration zu einer Erhöhung der Zellsteifigkeit in konfluenten Zellschichten führt, ist bislang unklar, ob hierfür die Verbindung benachbarter Zellmembranen über Zell-Zell-Adhäsionen oder die interzelluläre Verknüpfung von zytoskeletalen Komponenten ausschlaggebend ist. Um diese Frage zu klären, ist es erforderlich, Zellelastizitätsmessungen an den in dieser Arbeit verwendeten Zellen mit reduzierten Zell-Zell-Adhäsionen oder Zellen mit einer veränderten Verknüpfung des Zytoskeletts an Adhäsionsstrukturen in Ab- und Anwesenheit von Kalzium durchzuführen.

Desweiteren wurde durch diese Arbeit gezeigt, welchen enormen Einfluss artifizielle Zellkulturbedingungen auf das Zellverhalten und die mechanischen Eigenschaften lebender Zellen haben. Obgleich die vergleichende Analyse von Einzelzellen und konfluenten Zellschichten eine erste Annäherung an die Bedingungen *in vivo* ist, wäre eine Untersuchung lebender Organismen für die Funktionsanalyse bestimmter Proteine weniger artifiziell. Als Modellorganismus mit überschaubarer Komplexität, würde sich für diese Experimente *C. elegans* anbieten, welcher bereits ausführlich charakterisiert und in seiner Zellzahl konstant ist. Obgleich *C. elegans* keine Haut aufweist, sind der Aufbau eines intakten Keratinnetzwerk sowie die Ausbildung von Adhärenzverbindungen für die mechanischen Eigenschaften von Zellen auch in diesem Organismus von großer Bedeutung. Gleichzeitig bietet *C. elegans* den Vorteil, dass bereits zahlreiche, verschiedene Mutanten bekannt sind und dadurch vergleichbare Zellelastizitätsmessungen an nicht mutierten und mutierten Organismen denkbar sind. Mittels dieser vergleichenden Untersuchungen könnte der Einfluss eines funktionellen Keratinnetzwerkes auf die mechanischen Eigenschaften von

Zellen *in vivo* analysiert werden. Aufgrund seiner geringen Größe und seiner unkomplizierten Kultivierung sind bei *C. elegans* im Vergleich zu vielen anderen Modellorganismen sogar kraftspektroskopische Messungen an lebendigen Organismen möglich.

Erratum

Folgende Fehler wurden nachträglich korrigiert:

- Seite 11: ... weist Bindestellen für Adenosintriphosphat und Aktin auf ...
- Seite 13: ... Anlagerung von Kalziumionen ...
- Seite 20: Bei Hemidesmosomen handelt es sich um Multi-Protein-Komplexe ...
- Seite 50: ..., welcher unter Abschnitt 2.9 ab Seite 64 näher beschrieben wird.
- Seite 50: ... mit unterschiedlichen Proteinbeschichtungen verglichen...
- Seite 63: ... wurde der Positionsunterschied ...
- Seite 83: Für KTyI-/- -Zellen lag die Kraft, ...
- Seite 84: ..., die KTyI-/- -Zellschichten eine Steifigkeit von 1.160 N/m² ...
- Seite 86: ..., dass veränderte Keratinnetzwerke der KTyI-/- -, ...
- Seite 94: ... wiesen 64% der Zellen einen positiven Aktin-Anordnungs-Parameter ...
- Seite 104: Legende in Abbildung 49 wurde korrigiert. Vinc^{Ctrl} SC 4h Str / 0h Ca²⁺ (A')
- Seite 106: Abbildung 50 A zeigte fälschlicherweise dasselbe Diagramm wie Abbildung 49 A und wurde angepasst.
- Seite 111: ... Anpassung der Helligkeit wurde in ECadKO-Zellschichten ein spezifisches Signal des E-Cadherin-Antikörpers sichtbar.
- Seite 125: ..., ist das Protein Plectin ...
- Seite 143: ... könnte der Einfluss eines funktionellen Keratinnetzwerkes ...

Literatur

- [1] C. M. Chuong, B. J. Nickoloff, P. M. Elias, L.A. Goldsmith, E. Macher, P.A. Marderson, J. P. Sundberg, H. Tagami, P. M. Plonka, and et al. Thestrup-Pedersen, K. What is the true function of skin? *Exp Dermatol*, 11:159–187, 2002.
- [2] R. L. Eckert. Structure, function and differentiation of the keratinocyte. *Physiological Reviews*, 69:1316–1346, 1989.
- [3] T.-T. Sun, C. Shih, and H. Green. Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proc. Nati. Acad. Sci.*, 76:2813–2817, 1979.
- [4] G. Solanas and S. A. Benitah. Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14:737–748, 2013.
- [5] P. Quatresooz, T. Hermanns-Le, G. E. Pierard, P. Humbert, P. Delvenne, and C. Pierard-Franchimont. Ustekinumab in psoriasis immunopathology with emphasis on the th17-il23 axis: a primer. *J Biomed Biotechnol*, 2012:147413, 2012.
- [6] F. Elsholz, C. Harteneck, W. Muller, and K. Friedland. Calcium, a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *Eur J Dermatol*, 24:650–661, 2014.
- [7] H. Hennings, D. Michael, C. Cheng, P. Steinert, K. Holbrook, and S. H. Yuspa. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*, 19:245–254, 1980.
- [8] H. Hennings and K. Holbrook. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. *Exp Cell Res*, 143:127–142, 1983.
- [9] R. E. Leube, M. Moch, A. Kolsch, and R. Windoffer. Panta rhei: Perpetual cycling of the keratin cytoskeleton. *Bioarchitecture*, 1:39–44, 2011.
- [10] L. M. Godsel, R. P. Hobbs, and K. J. Green. Intermediate filament assembly: dynamics to disease. *Trends Cell Biol*, 18:28–37, 2008.
- [11] S. Kim and P. A. Coulombe. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev*, 21:1581–1597, 2007.

- [12] M. Hesse, A. Zimek, K. Weber, and T. M. Magin. Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur J Cell Biol*, 83:19–26, 2004.
- [13] L. H. Gu and P. A. Coulombe. Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Curr Opin Cell Biol*, 19:13–23, 2007.
- [14] C. H. Lee, M. S. Kim, B. M. Chung, D. J. Leahy, and P. A. Coulombe. Structural basis for heteromeric assembly and perinuclear organization of keratin filaments. *Nat Struct Mol Biol*, 19:707–715, 2012.
- [15] F. Loschke, K. Seltmann, J. E. Bouameur, and T. M. Magin. Regulation of keratin network organization. *Curr Opin Cell Biol*, 32:56–64, 2015.
- [16] P. A. Coulombe and M. B. Omary. Hard and soft principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol*, 14:110–122, 2002.
- [17] H. Herrmann and R. Foisner. Intermediate filaments: novel assembly models and exciting new functions for nuclear lamins. *Cell Mol Life Sci*, 60:1607–1612, 2003.
- [18] E. Fuchs and K. Weber. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 63:345–382, 1994.
- [19] S. V. Strelkov, H. Herrmann, and U. Aebi. Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays*, 25:243–251, 2003.
- [20] E. Fuchs and H. Green. Changes in keratin gene expression differentiation of the keratinocyte. *Cell*, 19:1033–1042, 1980.
- [21] E. Fuchs. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol*, 111:2807–2814, 1990.
- [22] D. DePianto and P. A. Coulombe. Intermediate filaments and tissue repair. *Exp Cell Res*, 301:68–76, 2004.
- [23] R. Windoffer, M. Beil, T. M. Magin, and R. E. Leube. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J Cell Biol*, 194:669–678, 2011.
- [24] R. Windoffer, A. Kolsch, S. Woll, and R. E. Leube. Focal adhesions are hotspots for keratin filament precursor formation. *J Cell Biol*, 173:341–348, 2006.

-
- [25] N.-O. Ku and M. B. Omary. Keratins turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion. *J Cell Biol*, 149:547–552, 2000.
- [26] G. Wiche. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci*, 111:2477–2486, 1998.
- [27] S. Osmanagic-Myers, M. Gregor, G. Walko, G. Burgstaller, S. Reipert, and G. Wiche. Plectin-controlled keratin cytoarchitecture affects map kinases involved in cellular stress response and migration. *J Cell Biol*, 174:557–568, 2006.
- [28] R. Foisner, F. E. Leichtfried, H. Herrmann, J. V. Small, D. Lawson, and G. Wiche. Cytoskeleton-associated plectin: In situ localization, in vitro reconstitution, and binding to immobilized intermediate filament proteins. *J Cell Biol*, 106:723–733, 1988.
- [29] K. Andrae, H. Lassmann, R. Bittner, S. Shorny, R. Fassler, F. Propst, and G. Wiche. Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes Dev*, 11:3143–3156, 1997.
- [30] J. R. McMillan, J. A. McGrath, M. J. Tidman, and R. A. Eady. Hemidesmosomes show abnormal association with the keratin filament network in junctional forms of epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 110:132–137, 1998.
- [31] L. P. Cramer, M. Siebert, and T. J. Mitchison. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: Implications for the generation of motile force. *J Cell Biol*, 136:1287–1305, 1997.
- [32] E. Lazarides. Immunofluorescence studies on the structure of actin filaments in tissue culture cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 23:507–528, 1975.
- [33] L. A. Cingolani and Y. Goda. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci*, 9:344–356, 2008.
- [34] K. Weber and U. Groeschel-Stewart. Antibody to myosin: The specific visualization of myosin-containing filaments in nonmuscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 71:4561–4564, 1974.
- [35] S. Pellegrin and H. Mellor. Actin stress fibres. *J Cell Sci*, 120:3491–3499, 2007.

- [36] J. V. Small, K. Rottner, I. Kaverina, and K. I. Anderson. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1404:271–281, 1998.
- [37] P. Hotulainen and P. Lappalainen. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol*, 173:383–394, 2006.
- [38] S. Getsios, E. V. Amargo, R. L. Dusek, K. Ishii, L. Sheu, L. M. Godsel, and K. J. Green. Coordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin 1 regulates intercellular adhesion. *Differentiation*, 72:419–433, 2004.
- [39] S. K. Runswick, M. J. O’Hare, L. Jones, C. H. Streuli, and D. R. Garrod. Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. *Nat Cell Biol*, 3:823–830, 2001.
- [40] F. Twiss and J. de Rooij. Cadherin mechanotransduction in tissue remodeling. *Cell Mol Life Sci*, 70:4101–4116, 2013.
- [41] M. J. Wheelock and P. J. Jensen. Regulation of keratinocyte intercellular junction organization and epidermal morphogenesis by e-cadherin. *J Cell Biol*, 117:415–425, 1992.
- [42] D. Leckband. Beyond structure: mechanism and dynamics of intercellular adhesion. *Biochem Soc Trans.*, 36:213–220, 2008.
- [43] S. F. Fenz, R. Merkel, and K. Sengupta. Diffusion and intermembrane distance: case study of avidin and e-cadherin mediated adhesion. *Langmuir*, 25:1074–1085, 2009.
- [44] N. Osmani and M. Labouesse. Remodeling of keratin-coupled cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol*, 32:30–38, 2015.
- [45] E. Fuchs and S. Raghavan. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet*, 3:199–209, 2002.
- [46] M. D. Kottke, E. Delva, and A. P. Kowalczyk. The desmosome: cell science lessons from human diseases. *J Cell Sci*, 119:797–806, 2006.
- [47] D. R. Garrod, A. J. Merritt, and Z. Nie. Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 14:537–545, 2002.

-
- [48] M. K. Han and J. de Rooij. Converging and unique mechanisms of mechanotransduction at adhesion sites. *Trends Cell Biol*, 26:612–623, 2016.
- [49] B. Geiger, K. T. Tokuyasu, A. H. Dutton, and S. J. Singer. Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell-membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:4127–4131, 1980.
- [50] M. Rudiger. Vinculin and alpha-catenin: shared and unique functions in adherens junctions. *Bioessays*, 20:733–740, 1998.
- [51] R. P. Johnson and S. W. Craig. An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 269:12611–12619, 1994.
- [52] C. Bakolitsa, D. M. Cohen, L. A. Bankston, A. A. Bobkov, G. W. Cadwell, L. Jennings, D. R. Critchley, S. W. Craig, and R. C. Liddington. Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature*, 430:583–586, 2004.
- [53] A. Carisey, R. Tsang, A. M. Greiner, N. Nijenhuis, N. Heath, A. Nazgiewicz, R. Kemkemer, B. Derby, J. Spatz, and C. Ballestrem. Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner. *Curr Biol*, 23:271–281, 2013.
- [54] H. Chen, D. M. Cohen, D. M. Choudhury, N. Kioka, and S. W. Craig. Spatial distribution and functional significance of activated vinculin in living cells. *J Cell Biol*, 169:459–470, 2005.
- [55] C. Guillot and T. Lecuit. Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis. *Science*, 340:1185–1189, 2013.
- [56] M. Yao, W. Qiu, R. Liu, A. K. Efremov, P. Cong, R. Seddiki, M. Payre, C. T. Lim, B. Ladoux, and et al. Mege, R. M. Force-dependent conformational switch of alpha-catenin controls vinculin binding. *Nat Commun*, 5:4525, 2014.
- [57] P. Atherton, B. Stutchbury, D. Jethwa, and C. Ballestrem. Mechanosensitive components of integrin adhesions: Role of vinculin. *Exp Cell Res*, 343:21–27, 2015.
- [58] A. Vite, J. Li, and G. L. Radice. New functions for alpha-catenins in health and disease: from cancer to heart regeneration. *Cell Tissue Res*, 360:773–783, 2015.

- [59] H. J. Choi, S. Pokutta, G. W. Cadwell, A. A. Bobkov, L. A. Bankston, R. C. Liddington, and W. I. Weis. α e-catenin is an autoinhibited molecule that coactivates vinculin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109:8576–8581, 2012.
- [60] E. S. Rangarajan and T. Izard. The cytoskeletal protein α -catenin unfurls upon binding to vinculin. *J Biol Chem*, 287:18492–18499, 2012.
- [61] D. L. Rimm, E. R. Koslov, P. Kebriaei, C. D. Cianci, and J. S. Morrow. α 1 (e)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of f-actin to the membrane adhesion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:8813–8817, 1995.
- [62] S. Pokutta and W. I. Weis. Structure of the dimerization and β -catenin-binding region of α -catenin. *Molecular Cell*, 5:533–543, 2000.
- [63] S. Pokutta, F. Drees, Y. Takai, W. J. Nelson, and W. I. Weis. Biochemical and structural definition of the α -catenin- and actin-binding sites of α -catenin. *J Biol Chem*, 277:18868–18874, 2002.
- [64] S. Yonemura, Y. Wada, T. Watanabe, A. Nagafuchi, and M. Shibata. α -catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat Cell Biol*, 12:533–542, 2010.
- [65] M. Cavey, M. Rauzi, P. F. Lenne, and T. Lecuit. A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of e-cadherin. *Nature*, 453:751–756, 2008.
- [66] B. M. Gumbiner. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:622–634, 2005.
- [67] J. L. Maitre and C. P. Heisenberg. Three functions of cadherins in cell adhesion. *Curr Biol*, 23:626–633, 2013.
- [68] J. Zhu, B. H. Luo, T. Xiao, C. Zhang, N. Nishida, and T. A. Springer. Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Mol Cell*, 32:849–861, 2008.
- [69] R. Zaidel-Bar. Evolution of complexity in the integrin adhesome. *J Cell Biol*, 186:317–321, 2009.
- [70] P. Kanchanawong, G. Shtengel, A. M. Pasapera, E. B. Ramko, M. W. Davidson, H. F. Hess, and C. M. Waterman. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 468:580–584, 2010.

-
- [71] L. B. Case, M. A. Baird, G. Shtengel, S. L. Campbell, H. F. Hess, M. W. Davidson, and C. M. Waterman. Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions. *Nat Cell Biol*, 17:880–892, 2015.
- [72] B. Geiger, J. P. Spatz, and A. D. Bershadsky. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10:21–33, 2009.
- [73] N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger. Force and focal adhesion assembly a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*, 3:466–472, 2001.
- [74] B. Geiger and A. Bershadsky. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol*, 13:584–592, 2001.
- [75] W. Xu, J. L. Coll, and E. D. Adamson. Rescue of the mutant phenotype by reexpression of full-length vinculin in null f9 cells; effects on cell locomotion by domain deleted vinculin. *J Cell Sci*, 111:1535–1544, 1998.
- [76] W. H. Goldmann and D. E. Ingber. Intact vinculin protein is required for control of cell shape, cell mechanics, and rac-dependent lamellipodia formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 290:749–755, 2002.
- [77] F. J. Alenghat, B. Fabry, K. Y. Tsai, W. H. Goldmann, and D. E. Ingber. Analysis of cell mechanics in single vinculin-deficient cells using a magnetic tweezer. *Biochem Biophys Res Commun*, 277:93–99, 2000.
- [78] A. W. Holle, X. Tang, D. Vijayraghavan, L. G. Vincent, A. Fuhrmann, Y. S. Choi, J. C. del Alamo, and A. J. Engler. In situ mechanotransduction via vinculin regulates stem cell differentiation. *Stem Cells*, 31:2467–2477, 2013.
- [79] D. Fudge, D. Russell, D. Beriault, W. Moore, E. B. Lane, and A. W. Vogl. The intermediate filament network in cultured human keratinocytes is remarkably extensible and resilient. *PLoS One*, 3:e2327, 2008.
- [80] D. R. Beriault, O. Haddad, J. V. McCuaig, Z. J. Robinson, D. Russell, E. B. Lane, and D. S. Fudge. The mechanical behavior of mutant k14-r125p keratin bundles and networks in neb-1 keratinocytes. *PLoS One*, 7:e31320, 2012.

- [81] P. A. Janmey, U. Euteneuer, P. Traub, and M. Schliwa. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J Cell Biol*, 113:155–160, 1991.
- [82] D. Russell, P. D. Andrews, J. James, and E. B. Lane. Mechanical stress induces profound remodelling of keratin filaments and cell junctions in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes. *J Cell Sci*, 117:5233–5243, 2004.
- [83] G. Fois, M. Weimer, T. Busch, E. T. Felder, F. Oswald, G. von Wichert, T. Seufferlein, P. Dietl, and E. Felder. Effects of keratin phosphorylation on the mechanical properties of keratin filaments in living cells. *The FASEB Journal*, 27:1322–1329, 2013.
- [84] U. Faust, N. Hampe, W. Rubner, N. Kirchgessner, S. Safran, B. Hoffmann, and R. Merkel. Cyclic stress at mhz frequencies aligns fibroblasts in direction of zero strain. *PLoS One*, 6:e28963, 2011.
- [85] J. H. C. Wang, P. Goldschmidt-Clermont, J. Wille, and F. C. P. Yin. Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching. *J Biomech*, 34:1563–1572, 2001.
- [86] C. Neidlinger-Wilke, E. Grood, L. Claes, and R. Brand. Fibroblast orientation to stretch begins within three hours. *Journal of Orthopaedic Research*, 20:953–956, 2002.
- [87] R. C. Buck. Reorientation response of cells to repeated stretch and recoil of the substratum. *Exp Cell Res*, 127:470–474, 1980.
- [88] S. Jungbauer, H. Gao, J. P. Spatz, and R. Kemkemer. Two characteristic regimes in frequency-dependent dynamic reorientation of fibroblasts on cyclically stretched substrates. *Biophys J*, 95:3470–3478, 2008.
- [89] K. Hayakawa, N. Sato, and T. Obinata. Dynamic reorientation of cultured cells and stress fibers under mechanical stress from periodic stretching. *Exp Cell Res*, 268:104–114, 2001.
- [90] M. Kanzaki, M. Nagasawa, I. Kojima, C. Sato, K. Naruse, M. Sokabe, and H. Iida. Molecular identification of a eukaryotic, stretch-activated nonselective cation channel. *Science*, 285:882–886, 1999.

-
- [91] Y. Sawada, M. Tamada, B. J. Dubin-Thaler, O. Cherniavskaya, R. Sakai, S. Tanaka, and M. P. Sheetz. Force sensing by mechanical extension of the src family kinase substrate p130cas. *Cell*, 127:1015–1026, 2006.
- [92] M. Tamada, M. P. Sheetz, and Y. Sawada. Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Dev Cell*, 7:709–718, 2004.
- [93] V. Niediek, S. Born, N. Hampe, N. Kirchgessner, R. Merkel, and B. Hoffmann. Cyclic stretch induces reorientation of cells in a src family kinase- and p130cas-dependent manner. *Eur J Cell Biol*, 91:118–128, 2012.
- [94] T. Q. Uyeda, Y. Iwadate, N. Umeki, A. Nagasaki, and S. Yumura. Stretching actin filaments within cells enhances their affinity for the myosin ii motor domain. *PLoS One*, 6:e26200, 2011.
- [95] K. Hayakawa, H. Tatsumi, and M. Sokabe. Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament. *J Cell Biol*, 195:721–727, 2011.
- [96] P. A. Coulombe, M. E. Hutton, A. Letal, A. Hebert, A. S. Paller, and E. Fuchs. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: Genetic and functional analyses. *Cell*, 66:1301–1311, 1991.
- [97] E. B. Lane, E. L. Rugg, H. Navsaria, I. M. Leigh, A. H. Heagerty, A. Ishida-Yamamoto, and R. A. Eady. A mutation in the conserved helix termination peptide of keratin 5 in hereditary skin blistering. *Nature*, 356:244–246, 1992.
- [98] R. Moll, M. Divo, and L. Langbein. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*, 129:705–733, 2008.
- [99] K. Seltmann, W. Roth, C. Kroger, F. Loschke, M. Lederer, S. Huttelmaier, and T. M. Magin. Keratins mediate localization of hemidesmosomes and repress cell motility. *J Invest Dermatol*, 133:181–190, 2013.
- [100] O. Boussadia, S. Kutsch, A. Hierholzer, V. Delmas, and R. Kemler. E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland. *Mechanisms of Development*, 115:53–62, 2002.
- [101] M. Hafner, J. Wenk, A. Nenci, M. Pasparakis, K. Scharffetter-Kochanek, N. Smyth, T. Peters, D. Kess, O. Holtkotter, and et al. Shephard, P. Keratin 14 cre transgenic

- mice authenticate keratin 14 as an oocyte-expressed protein. *Genesis*, 38:176–181, 2004.
- [102] C. Michels, T. Buchta, W. Bloch, T. Krieg, and C. M. Niessen. Classical cadherins regulate desmosome formation. *J Invest Dermatol*, 129:2072–2075, 2009.
 - [103] M. Moch, R. Windoffer, N. Schwarz, R. Pohl, A. Omenzetter, U. Schnakenberg, F. Herb, K. Chaisaowong, D. Merhof, and et al. Ramms, L. Effects of plectin depletion on keratin network dynamics and organization. *PLoS One*, 11:e0149106, 2016.
 - [104] C. M. Cesa, N. Kirchgessner, D. Mayer, U. S. Schwarz, B. Hoffmann, and R. Merkel. Micropatterned silicone elastomer substrates for high resolution analysis of cellular force patterns. *Rev Sci Instrum*, 78:034301, 2007.
 - [105] S. Wilhelm, B. Grobler, M. Gluch, and H. Heinz. Confocal laser scanning microscopy: principles. *Microscopy from Carl Zeiss*, 2003.
 - [106] L. Ramms, G. Fabris, R. Windoffer, N. Schwarz, R. Springer, C. Zhou, J. Lazar, S. Stiefel, N. Hersch, and et al. Schnakenberg, U. Keratins as the main component for the mechanical integrity of keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110:18513–18518, 2013.
 - [107] U. Maver, T. Maver, Z. Persin, M. Mozetic, A. Vesel, M. Gaberscek, and K. Stana-Kleinschek. *Polymer Characterization with the Atomic Force Microscope*. Yilmaz, F., 2013.
 - [108] H. Hertz. Ueber die beruehrung fester elastischer koerper. *Journal für die reine und angewandte Mathematik*, 92:156–171, 1881.
 - [109] S. A. Safran and R. De. Nonlinear dynamics of cell orientation. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 80:060901, 2009.
 - [110] R. Merkel, N. Kirchgessner, C. M. Cesa, and B. Hoffmann. Cell force microscopy on elastic layers of finite thickness. *Biophys J*, 93:3314–3323, 2007.
 - [111] A. Kolsch, R. Windoffer, and R. E. Leube. Actin-dependent dynamics of keratin filament precursors. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66:976–985, 2009.
 - [112] J. E. Bouameur, B. Favre, L. Fontao, P. Lingasamy, N. Begre, and L. Borradori. Interaction of plectin with keratins 5 and 14 dependence on several plectin domains and keratin quaternary structure. *J Invest Dermatol*, 134:2776–2783, 2014.

-
- [113] G. A. Rezniczek, J. M. de Pereda, S. Reipert, and G. Wiche. Linking integrin $\alpha 6 \beta 4$ -based cell adhesion to the intermediate filament cytoskeleton: Direct interaction between the $\beta 4$ subunit and plectin at multiple molecular sites. *J Cell Biol*, 141:209–225, 1998.
- [114] D. Geerts, L. Fontao, M. G. Nievers, R. Q. Schaapveld, P. E. Purkis, G. N. Wheeler, E. B. Lane, I. M. Leigh, and A. Sonnenberg. Binding of integrin $\alpha 6 \beta 4$ to plectin prevents plectin association with f-actin but does not interfere with intermediate filament binding. *J Cell Biol*, 147:417–434, 1999.
- [115] J. Koster, S. van Wilpe, I. Kuikman, S. H. Litjens, and A. Sonnenberg. Role of binding of plectin to the integrin $\beta 4$ subunit in the assembly of hemidesmosomes. *Mol Biol Cell*, 15:1211–1223, 2004.
- [116] J. M. De Pereda, E. Ortega, N. Alonso-Garcia, M. Gomez-Hernandez, and A. Sonnenberg. Advances and perspectives of the architecture of hemidesmosomes. *Cell Adhesion & Migration*, pages 361–364, 2009.
- [117] M. Homberg, L. Ramms, N. Schwarz, G. Dreissen, R. E. Leube, R. Merkel, B. Hoffmann, and T. M. Magin. Distinct impact of two keratin mutations causing epidermolysis bullosa simplex on keratinocyte adhesion and stiffness. *J Invest Dermatol*, 135:2437–2445, 2015.
- [118] K. Wilhelmsen, S. H. Litjens, I. Kuikman, N. Tshimbalanga, H. Janssen, I. van den Bout, K. Raymond, and A. Sonnenberg. Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol*, 171:799–810, 2005.
- [119] S. Szabo, K. L. Wogenstein, C. H. Osterreicher, N. Guldiken, Y. Chen, C. Doler, G. Wiche, P. Boor, J. Haybaeck, and et al. Strnad, P. Epiplakin attenuates experimental mouse liver injury by chaperoning keratin reorganization. *J Hepatol*, 62:1357–1366, 2015.
- [120] H. A. Long, V. Boczonadi, L. McInroy, M. Goldberg, and A. Maatta. Periplakin-dependent re-organisation of keratin cytoskeleton and loss of collective migration in keratin-8-downregulated epithelial sheets. *J Cell Sci*, 119:5147–5159, 2006.
- [121] T. M. Magin, P. Vijayaraj, and R. E. Leube. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res*, 313:2021–2032, 2007.

- [122] C. Kroger, F. Loschke, N. Schwarz, R. Windoffer, R. E. Leube, and T. M. Magin. Keratins control intercellular adhesion involving pkc-alpha-mediated desmoplakin phosphorylation. *J Cell Biol*, 201:681–692, 2013.
- [123] I. Anton-Lamprecht and U. W. Schnyder. Epidermolysis bullosa herpetiformis dowling-meara. report of a case and pathomorphogenesis. *Dermatologica*, 164:221–235, 1982.
- [124] E. Roh, B.-U. Hwang, D. Kim, B.-Y. Kim, and N.-E. Lee. Stretchable, transparent, ultrasensitive, and patchable strain sensor for human-machine interfaces comprising a nanohybrid of carbon nanotubes and conductive elastomers. *ASC NANO*, 9:6252–6261, 2015.
- [125] M. Amjadi, Y. J. Yoon, and I. Park. Ultra-stretchable and skin-mountable strain sensors using carbon nanotubes-ecoflex nanocomposites. *Nanotechnology*, 26:375501, 2015.
- [126] F. M. Watt and H. Green. Stratification and terminal differentiation of cultured epidermal cells. *Nature*, 295:434–436, 1982.
- [127] E. J. O’Keefe, R. A. Briggaman, and B. Herman. Calcium-induced assembly of adherens junctions in keratinocytes. *J Cell Biol*, 105:807–817, 1987.
- [128] B. Geiger, E. Schmid, and W. W. Franke. Spatial distribution of proteins specific for desmosomes and adhaerens junctions in epithelial cells demonstrated by double immunofluorescence microscopy. *Differentiation*, 23:189–205, 1983.
- [129] M. Opas, K. Turksen, and V. I. Kalnins. Adhesiveness and distribution of vinculin and spectrin in retinal pigmented epithelial cells during growth and differentiation in vitro. *Dev Biol*, 107:269–280, 1985.
- [130] A. F. Mertz, Y. Che, S. Banerjee, J. M. Goldstein, K. A. Rosowski, S. F. Revilla, C. M. Niessen, M. C. Marchetti, E. R. Dufresne, and V. Horsley. Cadherin-based intercellular adhesions organize epithelial cell-matrix traction forces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110:842–847, 2013.
- [131] M. Perez-Moreno, A. Avila, S. Islas, S. Sanchez, and L. Gonzalez-Mariscal. Vinculin but not alpha-actinin is a target of pkc phosphorylation during junctional assembly induced by calcium. *J Cell Sci*, 111:3563–3571, 1998.

-
- [132] B.M. Sefton, T. Hunter, and W. C. Raschke. Evidence that the abelson virus protein functions in vivo as a protein kinase that phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78:1552-1556, 1981.
- [133] K. J. Hodivala and F. M. Watt. Evidence that cadherins play a role in the downregulation of integrin expression that occurs during keratinocyte terminal differentiation. *J Cell Biol*, 124:589–600, 1994.
- [134] A. I. Magee, N. A. Lytton, and F. M. Watt. Calcium-induced changes in cytoskeleton and motility of cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res*, 172:43–53, 1987.
- [135] G. Isenberg, K. Leonard, and B. M. Jockusch. Structural aspects of vinculin-actin interactions. *J Mol Biol*, 158:231–249, 1982.
- [136] B. M. Jockusch and G. Isenberg. Vinculin and alpha-actinin: interaction with actin and effect on microfilament network formation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 46:613–623, 1982.
- [137] K. K. Wen, P. A. Rubenstein, and K. A. DeMali. Vinculin nucleates actin polymerization and modifies actin filament structure. *J Biol Chem*, 284:30463–30473, 2009.
- [138] K. A. DeMali, C. A. Barlow, and K. Burridge. Recruitment of the arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol*, 159:881–891, 2002.
- [139] S. Huveneers and J. de Rooij. Mechanosensitive systems at the cadherin-f-actin interface. *J Cell Sci*, 126:403–413, 2013.
- [140] Q. le Duc, Q. Shi, I. Blonk, A. Sonnenberg, N. Wang, D. Leckband, and J. de Rooij. Vinculin potentiates e-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin ii-dependent manner. *J Cell Biol*, 189:1107–1115, 2010.
- [141] A. Valbuena, A. M. Vera, J. Oroz, M. Menendez, and M. Carrion-Vazquez. Mechanical properties of beta-catenin revealed by single-molecule experiments. *Biophys J*, 103:1744–1752, 2012.
- [142] C. L. Avvisato, X. Yang, S. Shah, B. Hoxter, W. Li, R. Gaynor, R. Pestell, A. Tozeren, and S. W. Byers. Mechanical force modulates global gene expression and beta-catenin signaling in colon cancer cells. *J Cell Sci*, 120:2672–2682, 2007.

- [143] A. M. Shewan, M. Maddugoda, A. Kraemer, S. J. Stehbens, S. Verma, E. M. Kovacs, and A. S. Yap. Myosin 2 is a key rho kinase target necessary for the local concentration of e-cadherin at cell-cell contacts. *Mol Biol Cell*, 16:4531–4542, 2005.
- [144] A. I. Ivanov, M. Bachar, B. A. Babbin, R. S. Adelstein, A. Nusrat, and C. A. Parkos. A unique role for nonmuscle myosin heavy chain iia in regulation of epithelial apical junctions. *PLoS One*, 2:e658, 2007.
- [145] M. Smutny, H. L. Cox, J. M. Leerberg, E. M. Kovacs, M. A. Conti, C. Ferguson, N. A. Hamilton, R. G. Parton, R. S. Adelstein, and A. S. Yap. Myosin ii isoforms identify distinct functional modules that support integrity of the epithelial zonula adherens. *Nat Cell Biol*, 12:696–702, 2010.
- [146] W. A. Thomas, C. Boscher, Y. S. Chu, D. Cuvelier, C. Martinez-Rico, R. Seddiki, J. Heysch, B. Ladoux, J. P. Thiery, and et al. Mege, R. M. alpha-catenin and vinculin cooperate to promote high e-cadherin-based adhesion strength. *J Biol Chem*, 288:4957–4969, 2013.
- [147] M. Chrzanowska-Wodnicka and K. Burridge. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol*, 133:1403–1415, 1996.
- [148] A. M. Goldryn, B. A. Rioja, J. P. Spatz, C. Ballestrem, and R. Kemkemer. Force-induced cell polarisation is linked to rhoa-driven microtubule-independent focal-adhesion sliding. *J Cell Sci*, 122:3644–3651, 2009.
- [149] J. L. Bays, X. Peng, C. E. Tolbert, C. Guilluy, A. E. Angell, Y. Pan, R. Superfine, K. Burridge, and K. A. DeMali. Vinculin phosphorylation differentially regulates mechanotransduction at cell-cell and cell-matrix adhesions. *J Cell Biol*, 205:251–263, 2014.

Danksagung

Prof. Rudolf Merkel danke ich für die Möglichkeit, dass ich meine Doktorarbeit in seinem Insitut anfertigen konnte. Außerdem danke ich ihm für seine Unterstützung, seine Ratschläge und die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen.

Prof. Kubitscheck danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Schön, dass wir Jülicher immer auf Sie zählen können!

Bei Priv.-Doz. Bernd Hoffmann möchte ich mich für seine Betreuung, Unterstützung und die zahlreichen Ratschläge bedanken.

Meinen Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe Magin (Institute of Biology Division of Cell and Developmental Biology, Universität Leipzig), der Arbeitsgruppe Leube (Institute of Molecular and Cellular Anatomy, RWTH Aachen) und der Arbeitsgruppe Niessen (Department of Dermatology and CECAD, Universität Köln) danke ich für den wissenschaftlichen Austausch und die gute Zusammenarbeit.

Dr. Gloria Fabris und Barbara Nöthel danke ich für die erfolgreiche, ehrliche und schöne Zusammenarbeit. Mit euch hat die Arbeit auch zu sehr später oder sehr früher Stunde und an Feiertagen immer Spaß gemacht. Ich hätte mir keine besseren Kollegen als euch wünschen können.

Danke Dr. Ronald Springer für deine unermüdliche Geduld, die viele Zeit, die du mir geschenkt hast und die Nerven, die ich dich gekostet habe. Ohne dich wäre meine Arbeit niemals so schön formatiert.

Georg Dreissen danke ich für die zahlreichen Auswerteprogramme, die er für meine Arbeit geschrieben hat und die vielen Stunden, die ich in seinem Büro verbringen durfte.

Ich danke Dr. Gloria Fabris, Dr. Evelin Jaschinski, Barbara Nöthel, Dr. Ronald Springer,

Britta Steimel und Simone Stiefel, die in den letzten drei Jahren für mich mehr waren als nur Kollegen. Dank euch bin ich jeden Tag gerne nach Jülich gekommen. Ich hoffe, dass wir auch weiterhin in Kontakt bleiben, denn ich bin froh euch kennengelernt zu haben.

Nico Hampe danke ich für die schöne Bürozeit in den letzten vier Jahren.

Zum Schluss möchte ich mich beim gesamten ICS-7-Team für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und die nette Arbeitsatmosphäre bedanken.